

Aus dem Institut für Immunologie

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Axel Roers

**Die Bedeutung von GD3-7-Aldehyd als
Apoptosemediator und Oberflächenantigen**

DISSERTATIONSSCHRIFT

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Gesundheitswissenschaften

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Nadja Röber

aus Dresden

Dresden 2017

1. Gutachter

2. Gutachter

Tag der mündlichen Prüfung:

gez.:

Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Sphingolipide, Glycosphingolipide und Ganglioside.....	1
1.1.1	Biosynthese und Transport der Ganglioside	5
1.1.2	Biologische Funktionen und pathophysiologische Bedeutung der Ganglioside	10
1.2	Sialinsäuren.....	12
1.3	Das Disialogangliosid GD3	16
1.3.1	Vorkommen von GD3	16
1.3.2	Biologische Wirkungen von GD3	17
1.3.3	GD3 als Zielstruktur in der Tumorthherapie	20
1.3.4	Modifikationen der Sialinsäure von GD3	23
1.3.4.1	9-O-Acetylierung der terminalen Sialinsäure von GD3	23
1.3.4.2	Oxidation der terminalen Sialinsäure von GD3.....	25
1.4	Zielstellung	27
2	MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1	Materialien.....	28
2.1.1	Biologische Materialien	28
2.1.1.1	Patientenproben	28
2.1.1.2	Versuchstiere.....	28
2.1.1.3	Zelllinien und Hybridome	28
2.1.2	Reagenzien, Antikörper und Enzyme.....	29
2.1.3	Chemikalien.....	31
2.1.4	Geräte und Hilfsmittel	32
2.2	Methoden	34
2.2.1	Zellkultur.....	34
2.2.1.1	Kulturmedien.....	34
2.2.1.2	Zellkulturtechnik.....	35
2.2.1.3	Zellernte der Suspensionszellen	35
2.2.1.4	Zellernte der adhärenenten Zelllinien	35
2.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl	36
2.2.1.6	Kryokonservierung	36
2.2.1.7	Auftauen	37
2.2.1.8	Hybridomkultivierung	37
2.2.1.9	Kultur von AML Blasten	37
2.2.2	Durchflusszytometrie	37
2.2.2.1	Oberflächenfärbung von Zelllinien.....	38
2.2.2.2	Oberflächenfärbung von PBMC und Granulozyten.....	39
2.2.2.3	Intrazelluläre Färbung	39
2.2.2.4	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mittels DCFDA-Färbung	39
2.2.2.5	SubG1-Analyse.....	41
2.2.3	Aufarbeitung von Gangliosiden aus Zellen.....	41
2.2.3.1	Herstellung des Rohextraktes	42
2.2.3.2	Entsalzung des Extraktes an einer Reversed Phase Chromatographie-Säule	43
2.2.4	Dünnschichtchromatographie - HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatographie).....	44
2.2.4.1	Detektion mit Orcinfärbung	44

2.2.4.2 Detektion mit Primulin - Färbung	45
2.2.4.3 Detektion mit Overlay - Immunfärbung	45
2.2.5 Isolation von Glycolipiden aus lyophilisierter Buttermilch	47
2.2.5.1 Herstellung des Rohextraktes	48
2.2.5.2 Entsalzung mittels Dialyse	49
2.2.5.3 Si60-Kieselgel-Chromatographie	49
2.2.5.4 DEAE-Ionenaustauschchromatographie	50
2.2.5.5. Entsalzung mit RP-Säule	51
2.2.5.6 HPLC (High Performance Liquid Chromatographie).....	51
2.2.6 Herstellung von GD3-7-Aldehyd aus GD3	52
2.2.6.1 Oxidation von Gangliosiden <i>in situ</i> auf HPTLC-Platten	52
2.2.6.2 Darstellung von GD3-7-Aldehyd unter Verwendung von Wasserstoffperoxid und Eisen-II-chlorid (Fenton Reaktion).....	53
2.2.7 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen GD3-7-Aldehyd	53
2.2.7.1 Immunisierung der Mäuse.....	54
2.2.7.2 Vorbereitung der Myelomzellen.....	54
2.2.7.3 Präparation der Milzzellen.....	55
2.2.7.4 Fusion der Milz- und Myelomzellen	55
2.2.7.5 Selektion und Klonierung	56
2.2.7.5.1 Screening.....	56
2.2.7.5.2 Ermittlung der Spezifität	57
2.2.7.5.3 Bestimmung der Immunglobulinklasse und des Subtyps	57
2.2.8 Separation mononukleärer Zellen (PBMCs) und Granulozyten aus Vollblut.....	57
2.2.8.1 Isolation einzelner Leukozytenpopulationen mittels MACS Technologie	58
2.2.8.1.1 Positivselektion von Monozyten	58
2.2.8.1.2 Positivselektion von Slan-DCs mit M-DC8.....	58
2.2.9 Generierung und Maturierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten	59
2.2.10 Indirekte Immunfluoreszenz	60
2.2.10.1 Aufzentrifugieren von Suspensionszellen auf Objektträger	60
2.2.10.2 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen auf Objektträgern	60
2.2.10.3 Fluoreszenzfärbung von Zellen und Geweben auf Objektträgern.....	60
2.2.11 Immunhistochemische Färbung mit modifizierter ABC-Methode	61
2.2.12 Behandlung von HL60 mit GD3-7-Aldehyd	62
2.2.13 Inkubationsversuche von Molt-4 mit unterschiedlichen GD3-Derivaten	63
2.2.14 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in HEp-2 durch UV-Bestrahlung	63
3 ERGEBNISSE	64
3.1 Darstellung der Glycolipidantigene GD3, 9-O-acetyl-GD3 und GD3-7-Aldehyd	65
3.1.1 Isolation von GD3 und 9-O-acetyl-GD3 aus lyophilisierter Buttermilch	65
3.1.1.1 Reinigung des Rohextraktes über Si60-Kieselgelchromatographie	65
3.1.1.2 Reinigung des Glycolipidgemisches über DEAE-Sepharose- Ionenaustauschchromatographie	66
3.1.1.3 Reinigung der Ganglioside GD3 und 9-O-acetyl-GD3 mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC).....	67
3.1.1.4 Quantifizierung des gewonnenen Gangliosids GD3	69
3.1.1.5 Aufarbeitung von Gangliosidproben zur Gewinnung von 9-O-acetyl-GD3	70
3.1.2 Darstellung von GD3-7-al aus GD3 unter Verwendung von Natriumperjodat	71
3.2 Herstellung eines GD3-7-Aldehyd-spezifischen monoklonalen Antikörpers	73
3.2.1 Milzpräparation und Fusion.....	75
3.2.2 Entwicklung einer Screening-Methode für Hybridoma-Überstände	75
3.2.3 Vermehrung und Klonierung der produzierenden Zellen	77
3.2.4 Spezifität der Klone.....	77
3.2.5 Sensitivität der glycolipidspezifischen monoklonalen Antikörper	82
3.2.6 Nutzbarkeit des Antikörpers 10C6 für die Durchflusszytometrie.....	85

3.3 Apoptoseinduktion mit unterschiedlichen GD3-Derivaten an Molt-4-Zellen	86
3.4 Darstellung von GD3-7-al <i>in vitro</i> unter Bedingungen des oxidativen Stresses	88
3.5 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd in biologischen Materialien	89
3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit den Antikörpern R24, M-T6004 und 10C6 auf verschiedenen Primatengeweben	89
3.5.2 Immunhistochemie mit den Antikörpern R24, M-T6004 und 10C6 auf humanem Darmgewebe	92
3.5.3 GD3-Metabolite im Lipidextrakt verschiedener Tumorzelllinien	93
3.5.4 GD3-Metabolite in Tumorgeweben	95
3.5.5 Nachweis von GD3-7-Aldehyd in peripheren mononukleären Blutzellen	97
3.5.5.1 Identifizierung der GD3-7-Aldehyd-haltigen Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie	98
3.5.5.2 Untersuchung 6-Sulfo-LacNAc-dendritischer Zellen aus peripherem Blut auf das Vorkommen von GD3-7-Aldehyd	100
3.5.5.3 Untersuchung der von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDCs)	101
3.5.5.4 Untersuchung von Granulozyten	103
3.5.5.5 Vorkommen von GD3 und GD3-7-Aldehyd auf der Oberfläche von AML- Blasten	105
3.6 Untersuchung der Eignung von GD3-7-Aldehyd als mögliche Zielstruktur für eine immunologische Tumorthapie	107
3.6.1 Auswirkung von Bestrahlung und Wasserstoffperoxidinkubation auf die Ausprägung des 10C6 - Antigens auf der Oberfläche von AML-Blasten	107
3.6.2 Oxidation des Gangliosides GD3 auf der Oberfläche von Melanomzellen	108
3.6.3 Untersuchung der Ausprägung des 10C6-Antigens auf der Oberfläche von HEp-2-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies	109
3.6.4 Untersuchung der Ausprägung von GD3-7-Aldehyd auf der Oberfläche von SK-Mel-23-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies	112
3.6.5 Nachweis der Einlagerung von GD3-7-Aldehyd in die Zellmembran von HL60- Zellen	114
3.6.5.1 Nachweis des integrierten GD3-7-Aldehyd in Abhängigkeit von der Zeit	115
4 DISKUSSION	117
4.1 Untersuchung von GD3-7-Aldehyd – der Weg vom Apoptosemediator zum Tumortarget	117
4.2 Darstellung der Glycolipidantigene GD3, 9-O-acetyl-GD3 und GD3-7-Aldehyd	118
4.3 GD3-7-Aldehyd als Effektormolekül der mitochondrial vermittelten Apoptose	120
4.4 Gangliosidspezifische Antikörper	124
4.4.1 Immunogenität von nativen und modifizierten Gangliosiden	124
4.4.2 Auswahl antikörperproduzierender Zellklone mit neuem Screeningverfahren	127
4.4.3 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers 10C6	127
4.4.4 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers R24	128
4.4.5 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers M-T6004	129
4.4.6 Nutzbarkeit des monoklonalen Antikörpers 10C6 für die Durchflusszytometrie und die indirekte Immunfluoreszenz	129
4.5 Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen	129
4.5.1 Darstellung von GD3-7-al <i>in vitro</i> unter Bedingungen des oxidativen Stresses	130

4.6 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd in biologischen Systemen	131
4.6.1 Gewebefärbungen	131
4.6.2 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd in Tumorzellen	132
4.6.3 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd auf peripheren mononukleären Blutzellen	135
4.7 Tumortargeting mit GD3-7-Aldehyd	137
4.7.1 Untersuchung des Vorkommens von GD3-7-Aldehyd in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies.....	137
4.7.2 Dekorationsversuche HL60.....	138
4.7.3 Einbau veränderter Sialinsäuren als Therapiemodell	138
4.8 Ausblick	141
5 ZUSAMMENFASSUNG	143
6 LITERATURVERZEICHNIS	147
ANHANG	159
Abkürzungen	159
Abbildungen	162
Tabellen	166
Danksagung	167
THESEN	168
ANLAGE 1	169
ANLAGE 2	170

1 Einleitung

1.1 Sphingolipide, Glycosphingolipide und Ganglioside

Als Johann Ludwig Wilhelm Thudichum 1874 die Sphingolipide entdeckte, erschienen ihm deren Eigenschaften und Funktionen so rätselhaft wie die Sphinx der griechischen Mythologie. Aufgrund dieser Assoziation wählte er die Bezeichnung „*Sphingolipide*“ für diese Gruppe von amphiphatischen Membran- und Strukturlipiden (Yamakawa, 1996; Merrill et al., 1997; van Echten & Herget, 2006).

Allen Mitgliedern dieser Gruppe ist gemeinsam, dass sie aus einem Molekül des Aminoalkohols Sphingosin (4-Sphingenin) oder einem seiner Derivate, einer langkettigen Fettsäure und einer polaren Kopfgruppe zusammengesetzt sind.

Im Fall der Glycosphingolipide (GSL) handelt es sich bei der polaren Kopfgruppe um einen Kohlenhydratrest. Ist diese Kopfgruppe jedoch ein Phosphoethanolamin- oder Phosphocholinrest, ergibt sich daraus Sphingomyelin.

Durch die Verknüpfung der Aminogruppe des Sphingosins mit der Carboxygruppe der Fettsäure entsteht unter Bildung eines Säureamids Ceramid. Diese Komponente bildet den hydrophoben Teil aller Sphingolipide, während die polare Glycankette der Glycosphingolipide hydrophile Eigenschaften besitzt.

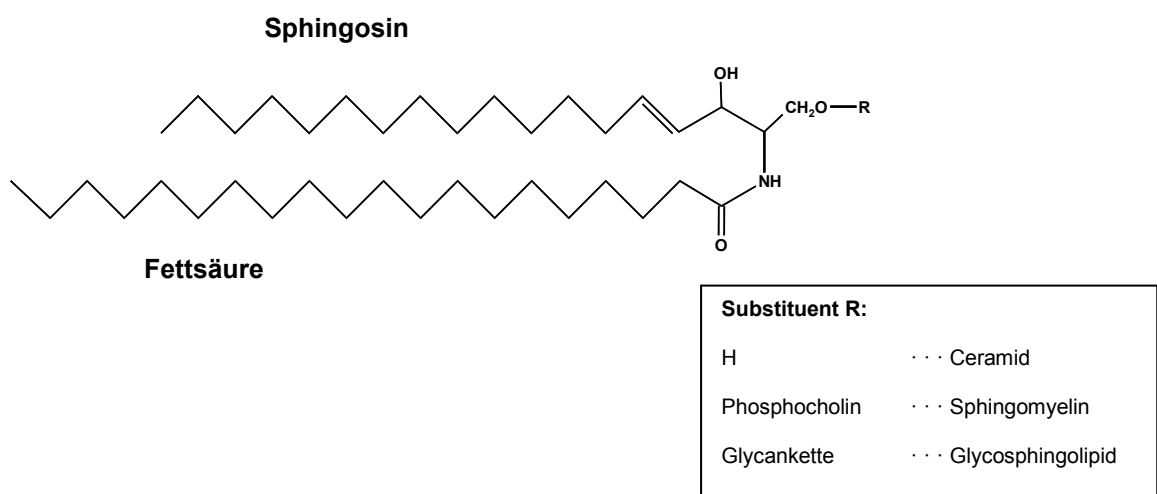


Abbildung 1.1: Grundstruktur der Glycosphingolipide

Die Glycosphingolipide lassen sich in drei Unterklassen einteilen, die sich durch Unterschiede in den polaren Kopfgruppen auszeichnen:

- Neutrale Glycolipide
- schwefelhaltige Glycolipide (Sulfatide)
- Ganglioside

Die Neutralen Glycolipide weisen eine Glycankette aus einem oder mehreren neutralen Zuckern auf und sind nicht elektrisch geladen. Besteht der Kohlenhydratanteil lediglich aus einem Monosaccharid, spricht man von einem Cerebrosid. In kurzkettigen Neutralen Glycolipiden bilden vor allem D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal) sowie N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) und N-Acetyl-D-Galactosamin (GalNAc) die Glycankette. In langkettigen GSL ist auch Fucose anzutreffen.

Die sogenannten Sulfatide enthalten in der Regel nur ein Monomer Glucose oder Galactose, welches am 3. Kohlenstoffatom mit Schwefelsäure verestert ist. Da diese Sulfatgruppe meist dissoziiert vorliegt, sind Sulfatide negativ geladen.

Ganglioside sind Glycosphingolipide mit mindestens einer Sialinsäure im Oligosacharidteil. Sie unterscheiden sich in der Kettenlänge des Kohlenhydratteils und in der Anzahl der Sialinsäuren.

Bei neutralem pH-Wert liegt die Carboxygruppe der Sialinsäure dissoziiert vor, daher tragen Ganglioside eine negative Ladung. Man spricht auch von sauren Glycosphingolipiden.

Ernst Klenk isolierte 1935 eine weiße phosphorfreie Substanz aus der Lipidfraktion des Hirns eines Patienten mit Morbus Nieman-Pick und nannte das Produkt zunächst *Substanz X*, in der Annahme eine homogene Substanz vor sich zu haben. In den folgenden Jahren fand er heraus, dass die Gehirne von Patienten mit Tay-Sachs-Erkrankung noch größere Mengen dieses Produktes aufwiesen. Da es sich vor allem in der grauen Substanz des Zentralen Nervensystems fand, prägte er den Namen Gangliosid (Yamakawa, 1996).

Heute weiß man, dass die Ganglioside eine große Substanzfamilie darstellen. Obwohl in Vertebraten nur sieben Monosaccharidtypen vorkommen, sind über 400 verschiedene Gangliosidstrukturen bekannt (Ichikawa & Hirabayashi, 1998). Eine systematische Bezeichnung ist daher unumgänglich.

Die *Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) hat 1997 für Glycolipide eine systematische Nomenklatur entwickelt, die Auskunft über Art, Anzahl und Position der Saccharide, der Sialinsäuren sowie über die Bindungstypen gibt (Chester, 1998).

Nicht alle theoretisch möglichen Kohlenhydratsequenzen existieren in der Natur. In Abhängigkeit der enzymatischen Ausstattung der jeweiligen Zelle kommen nur bestimmte Oligosaccharidketten gehäuft vor.

Zur Systematisierung können GSL daher in die in Tabelle 1.1 aufgeführten Strukturfamilien eingeteilt werden:

Tabelle 1.1: Die häufigsten Kohlenhydratsequenzen als Strukturfamilien nach IUPAC
(Chester, 1998)

Struktur nach IUPAC	Bezeichnung der Strukturfamilie
Gal β 1-3GalNac β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	Ganglioreihe
GalNac β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	Globoreihe
Gal β 1-3GalNac β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	Lactoreihe
Gal β 1-4GlcNac β 1-3 Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	Neolactoreihe

Für Ganglioside sind dazu noch Angaben über die Sialinsäuren erforderlich.

Da die Bezeichnungen der IUPAC relativ lang sind, ist weiterhin die ältere, wenn auch weniger systematische, Benennung nach Svennerholm gebräuchlich.

Dabei steht der erste Buchstabe G für Gangliosid der Ganglioreihe, der zweite Buchstabe gibt Auskunft über die Anzahl der enthaltenen Sialinsäuren, z.B. D für disialo-. Die folgende Zahl verweist auf die Anzahl der Zucker der Glycankette. Da Svennerholm davon ausging, dass Ganglioside maximal fünf Monosaccharide enthalten und er die Positionen vom terminalen Ende aus benannte, ergibt sich die Zahl der Zucker des Moleküls aus der angegebenen Ziffer, subtrahiert von Fünf. Bei Gangliosiden, die sich nur in der Position der Sialinsäuren unterscheiden, geben Kleinbuchstaben Auskunft über die jeweilige Variante (Svennerholm, 1963).

In Tabelle 1.2 sind die Bezeichnungen für die Arbeit wesentlicher Ganglioside in beiden Schreibweisen aufgeführt.

Tabelle 1.2: Einige Beispiele der beiden Benennungen; modifiziert nach Chester, 1998

IUPAC-Nomenklatur	Bezeichnung nach Svennerholm
Gal β 3GalNAc β 4(Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GM1a
Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4GlcCer	GM1b
GalNAc β 4(Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GM2
Neu5Ac α 3Gal β 4GlcCer	GM3
Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4(Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GD1a
Gal β 3GalNAc β 4(Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GD1b
GalNAc β 4(Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GD2
Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3Gal β 4GlcCer	GD3
Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4(Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GT1a
Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4(Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GT1b
Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc β 4(Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer	GQ1b

In dieser Arbeit wird zur Erhaltung des Textflusses auf die Nomenklatur nach Svennerholm zurückgegriffen.

1.1.1 Biosynthese und Transport der Ganglioside

Ganglioside stellen sekundäre Genprodukte dar. Das heißt, ihre Struktur selbst ist nicht genetisch verankert, wohl aber die der Enzyme, welche die Synthese katalysieren.

Die gemeinsame Grundstruktur der Glycosphingolipide, das Ceramid, kann in der Zelle auf zwei verschiedenen Wegen entstehen. Zum einen durch *de novo* Synthese und zum anderen durch den enzymatischen Abbau von Sphingomyelin und Glycosphingolipiden der Plasmamembran.

Die *de novo* Synthese des Ceramids findet auf der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt (Abb. 1.2, Punkt 1). Zunächst kondensieren Serin und Palmitoyl-CoA, ein Vorgang, der durch die Serin-Palmitoyl-Transferase katalysiert wird. Dabei entsteht 3-Keto-dihydrosphingosin, welches zu Dihydrosphingosin (Sphinganin) reduziert und im Anschluss durch das Enzym Ceramid-Synthase zu Dihydroceramid N-acyliert wird. Es wurden bisher sechs verschiedene Ceramidsynthasen nachgewiesen, die jeweils eine eigene Substratpräferenz für Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen zeigen.

Durch das Einfügen einer *trans*-Doppelbindung zwischen dem 4. und 5. Kohlenstoffatom durch die Dihydroceramiddesaturase entsteht letztlich Ceramid. Von der cytosolischen Seite des ER wird Ceramid zum einen in Form von Vesikeln, zum anderen über ein Ceramid-Transfer-Protein (CERT) zum Golgi-Apparat transportiert (Abb.1.2, Punkt 2).

Entsteht Ceramid auf dem Weg des Abbaus von Sphingomyelin oder GSL, erfolgt deren Abbau zunächst in den Lysosomen. Sphingomyelin wird in erster Linie durch die saure Sphingomyelinase in Phosphocholin und Ceramid gespalten, die Kohlenhydratketten der GSL werden durch eine Reihe spezifischer Hydrolasen abgebaut (Bartke & Hannun, 2009; Daniotti & Bartolomé, 2011).

Der erste Schritt der eigentlichen Glycolipidsynthese ist der Transfer von Glucose oder Galactose an Ceramid durch die Glucosyl- oder Galactosyltransferase.

Beide Enzyme sind von völlig unterschiedlicher Struktur und Lokalisation.

Die Glucosyltransferase ist ein Typ III-Enzym mit N-terminaler Kopplung an die Golgi-Membran, dessen katalytische Domäne ins Cytosol ragt.

Die Galactosyltransferase dagegen ist ein TYP I-Enzym, welches mit einer Transmembrandomäne nahe des C-Terminus in der Membran des ER fixiert ist und dessen katalytische Domäne ins Lumen ragt (Ichikawa & Hirabayashi, 1998). Aus

Galactosylceramid (GalCer) werden in erster Linie die schwefelhaltigen Sulfatide synthetisiert, welche einen wesentlichen Bestandteil der Myelinscheiden der Neuronen bilden (Eckhardt, 2008).

Die Synthese von Glucosylceramid (GlcCer) erfolgt also auf der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates. Die Synthese von Sphingomyelin sowie komplexerer Glycosphingolipide wie der Ganglioside (Abb.1.2, Punkt 3) findet hingegen im Lumen des Golgi statt (Lannert et al., 1998). GlcCer wird durch das Transportprotein FAPP2 ins Innere des Golgi geleitet (Yamaji et al. 2008). Alternativ dazu kann der Transport auch über das MDR1 P-Glycoprotein erfolgen, welches für die *multi drug resistance* einiger Zellen verantwortlich ist (van Meer & Lismann, 2002).

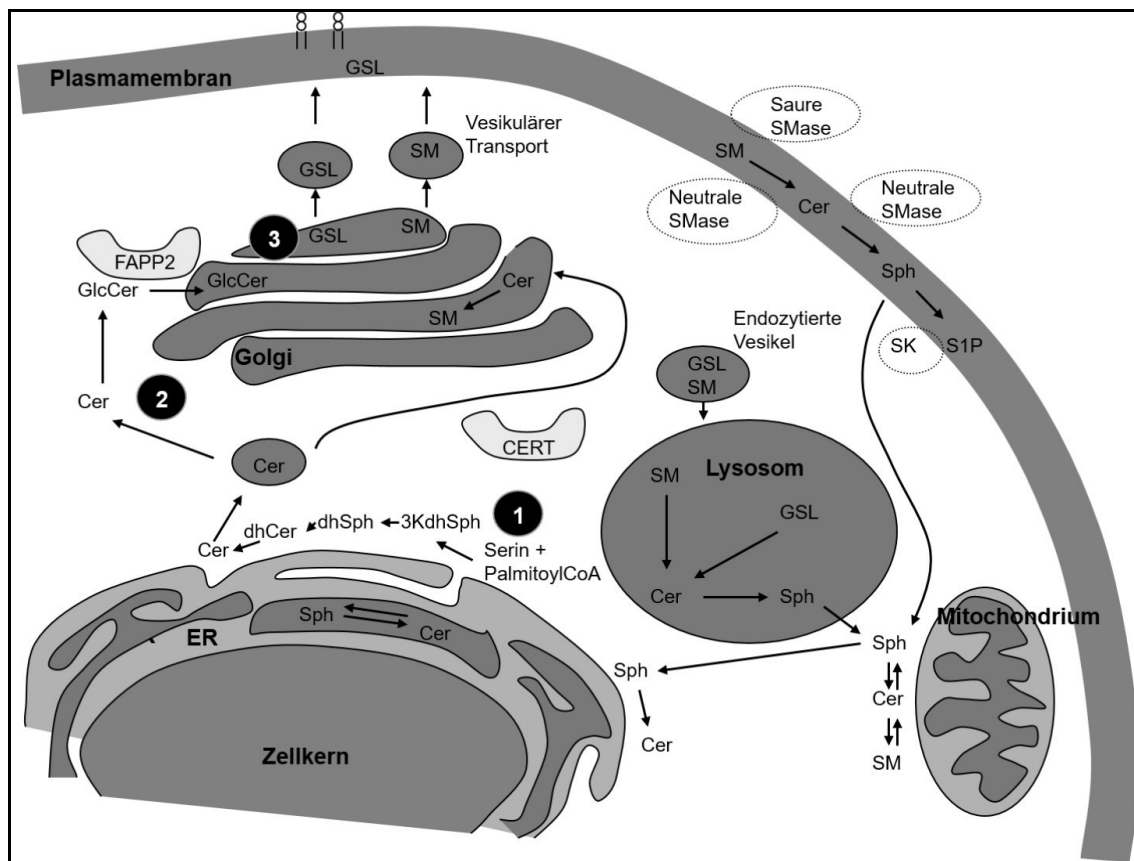


Abbildung 1.2: Lokalisation der Metabolite und Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels in den Zellkompartimenten

(nach Bartke & Hannun, 2009)

1: de novo Synthese des Ceramids, 2: Transport des Ceramids, 3: Synthese der höheren Glycosphingolipide

Abkürzungen: Cer, Ceramid; CERT, Ceramid Transfer Protein; ER, Endoplasmatisches Retikulum; dhCer, Dihydroceramid; dhSph, Dihydrosphingosin; GlcCer, Glucosylceramid 3KdhSph, 3-Keto-Dihydrosphingosin; SK, Sphingosinkinase; SM, Sphingomyelin; SMase, Sphingomyelinase; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; Sph, Sphingosin.

Bei den Glycosyltransferasen, welche die folgenden Schritte der Glycolipidsynthese im Golgi katalysieren, handelt es sich um Typ II Membranproteine bzw.-enzyme. Diese haben einen kurzen cytoplasmatischen Anteil, eine in der Golgimembran verankerte Transmembranregion und eine zum Lumen des Golgi-Apparates hin orientierte katalytische Domäne (Colley, 1997).

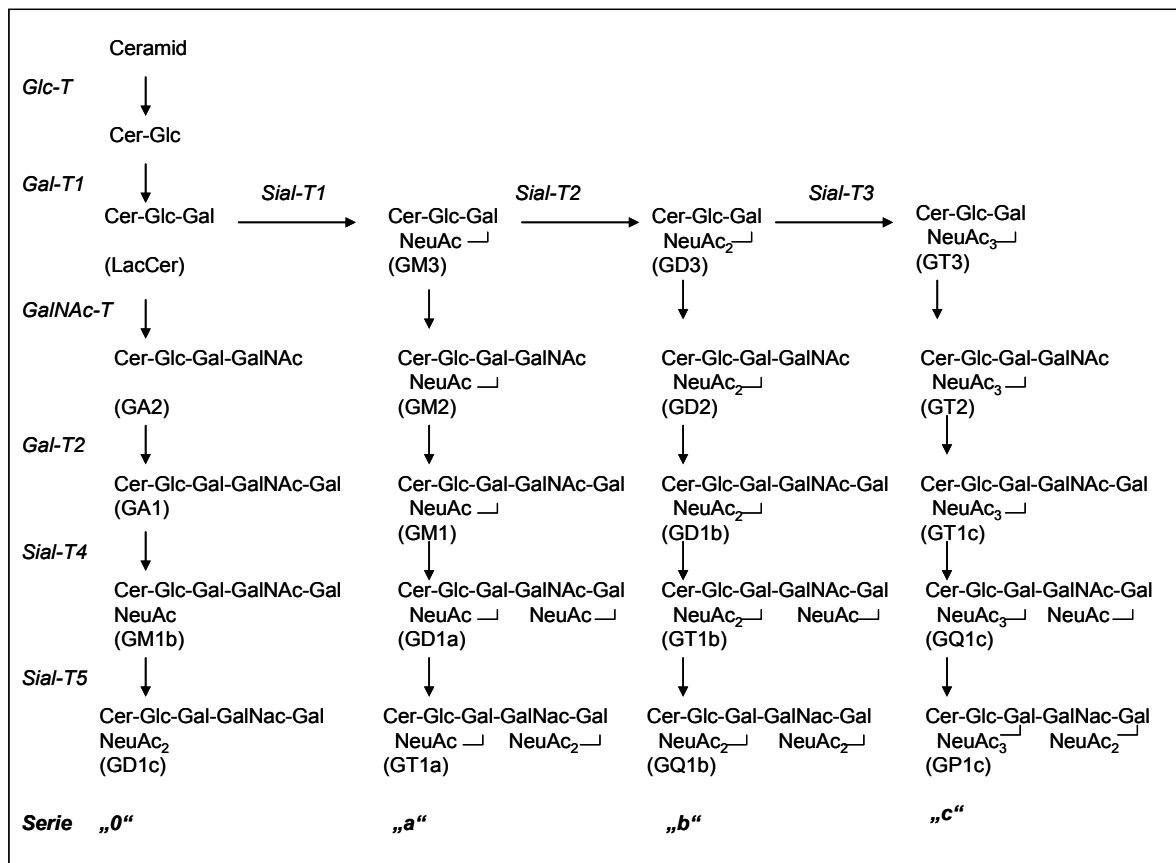


Abbildung 1.3: Schema der Biosynthesewege der Ganglioside der 0-, a-, b-, und c-Serie

(nach Maccioni *et al.*, 1999).

Abkürzungen: Glc-T, UDP-Glc:Ceramide Glucosyltransferase; Gal-T1, UDP-Gal:Glucosylceramid Galactosyltransferase; Gal-T2, UDP-Gal:GA2/GM2/GD2/GT2 Galactosyltransferase; GalNAc-T, UDP-GalNAc:LacCer/GM3/GD3/GT3 *N*-acetylgalactosaminyltransferase; Sial-T1, CMP-NeuAc:Lactosylceramid Sialyltransferase; Sial-T2, CMP-NeuAc:GM3 Sialyltransferase; Sial-T3, CMP-NeuAc:GD3 Sialyltransferase; Sial-T4, CMP-NeuAc:GA1/GM1/GD1b/GT1c Sialyltransferase; Sial-T5, CMP-NeuAc:GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c Sialyltransferase

Die Substrate und Produkte der einzelnen Enzyme sind in Abb. 1.3 dargestellt.

An GlcCer wird durch eine Galactosyltransferase ein Galactoserest von UDP-Galactose übertragen, es entsteht Lactosylceramid.

Durch das Konjugieren der Galactose mit Sialinsäure durch die α -2,3 Sialyltransferase entsteht das Monosialogangliosid GM3.

Komplexere Glycanketten werden durch das Ankoppeln zusätzlicher Monosaccharide synthetisiert, die durch weitere Sialyltransferasen zu Di-, Tri und Tetrasialoganglioside sialyliert werden können. Je nach Anzahl der Sialinsäurereste an der proximalen Galactose, spricht man von Gangliosiden der a-, b oder c-Serie (Kolter et al., 2002; van Echten-Deckert & Herget, 2006).

Die komplexen GSL können in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert werden (Bartke & Hannun, 2009). Die Möglichkeiten des Transportes als Monomer oder gebunden an Transportproteine sind ebenfalls beschrieben worden (Warnock et al., 1994).

Durch enge Kontaktstellen zwischen ER und Trans-Golgi-Netzwerk, sowie zwischen ER und Mitochondrien können GSL zwischen den Membranen ausgetauscht werden.

Diese Kontaktstellen zwischen den Organellen werden als generelle Orte des Lipidaustauschs gesehen (Marsh et al., 2001; van Meer et al., 2002).

An verschiedenen polarisierten Zelllinien wurde eine ungleiche Verteilung der Glycolipide zwischen apikaler und basolateraler Membran beobachtet. Beispielsweise werden in polarisierten Hundenieren-Epithelzellen komplexe GSL wie GM1 oder GD3 vor allem zur apikalen Membran transportiert und dort angereichert (Daniotti & Bartolomé, 2011).

Zwischen Synthese und Degradierung besteht normalerweise eine Homöostase.

Der Abbau von GSL erfolgt, wie bereits erwähnt, im Inneren der Lysosomen durch das Wirken von Glycosylhydrolasen. Jede Stufe des Abbaus erfordert ein spezielles Enzym und ein Aktivatorprotein. Bei einem Defekt oder dem Fehlen eines dieser Enzyme oder Aktivatoren kommt es zur Anreicherung des entsprechenden Substrates und damit zu einer Glycolipidspeicherkrankheit wie z.B. Tay-Sachs-Syndrom oder Morbus Gaucher (Schuette et al., 1999).

GSL, welche von außen in die Zelle inkorporiert werden, unterliegen einer Sortierung durch die Endosomen und werden entweder zum Golgi-Apparat oder direkt zu den

Lysosomen weitergeleitet. Ein Teil wird zurück zur Plasmamembran transportiert (Kok et al., 1991).

In neueren Untersuchungen konnten auch Glycosyltransferasen direkt an der Plasmamembran nachgewiesen werden.

So ist zum Beispiel eine Sialyltransferase der Plasmamembran in der Lage, sowohl endogen synthetisiertes, als auch exogen zugeführtes GM3 direkt an der Plasmamembran zu GD3 zu sialylieren (Crespo et al., 2010).

Eine andere Studie zeigt, dass diese Sialyltransferase (ecto-Sial-T2) sowohl GM3 der eigenen Membran (*cis*-katalytische Aktivität) als auch Ganglioside in der Membran benachbarter Zellen (*trans*-katalytische Aktivität) sialylieren kann (Vilcaes et al., 2011).

1.1.2 Biologische Funktionen und pathophysiologische Bedeutung der Ganglioside

Ganglioside kommen vor allem auf der Oberfläche der Plasmamembranen sowie in intrazellulären Membranen aller Vertebratenzellen vor. Dies ist jedoch zellspezifisch und differenzierungsabhängig (Hakomori & Igarashi, 1995).

Die Ganglioside der Zelloberfläche sind mit ihrem hydrophoben Ceramidteil im äußeren Blatt der Membran verankert, während die polare Kopfgruppe in den Extrazellulärraum ragt.

Sie bilden in der Plasmamembran zusammen mit Cholesterin, Sphingomyelin und GPI-verankerten Proteinen rigide Bereiche mit verminderter Membranfluidität, sogenannte *Lipid-rafts* (van Meer & Lisman, 2002; Posse de Chaves & Sipione, 2010; Simons & Ikonen, 1997).

Einige Ganglioside haben Rezeptor- und Korezeptorfunktionen für Liganden wie Zytokine und Hormone. Andere stellen Bindungsstellen für Mikroorganismen und deren Toxine oder für Viren dar. Sie sind wesentliche Modulatoren für Membranrezeptoren, Ionenkanäle und Signalkaskaden. Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die Zusammenführung von relevanten Molekülen in den glycolipidreichen Mikrodomänen (Posse de Chaves & Sipione, 2010).

Ganglioside sind an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt.

Einige von ihnen können die Effekte von Wachstumsfaktoren bzw. ihre Wirkung auf Rezeptor-Kinasen verstärken. So kann zum Beispiel GM1 auf dem Wege der synergistischen Verstärkung von *nerve growth factor* (NGF) -abhängiger NGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase die Differenzierung von Nervenzellen induzieren (Duchemin et al., 2008).

Während die in großen Mengen in den Ganglienzellen des Zentralen Nervensystems vorkommenden Ganglioside vor allem der Strukturfamilie der Ganglioreihe angehören, treten die GSL der Globoreihe vor allem bei den Blutgruppenantigenen der Erythrozyten in Erscheinung (Klenk & Lauenstein, 1951). Die Moleküle aus der Neolactoreihe werden vor allem in humanen Granulocyten gefunden (Fukuda et al., 1985).

Ganglioside erlangen zunehmend Bedeutung als tumorassoziierte Antigene. Sie liefern damit Zielstrukturen immunologischer Krebstherapien. So werden die Disialoganglioside GD2 und GD3 sowie das Monosialogangliosid GM3 häufig verstärkt auf der Oberfläche von Tumorzellen neuroektodermalen oder epithelialen Ursprungs, wie zum Beispiel Neuroblastomen oder Melanomen gefunden. Die Ganglioside der Tumorzellen sorgen für deren Haftung auf Matrices (Cheresh et al., 1986).

Die Möglichkeiten, die sich aus einer Therapie mit entsprechenden glycolipidspezifischen Antikörpern ergeben, sind Gegenstand der Untersuchungen zahlreicher Arbeitsgruppen.

Es wurden zum Beispiel Therapieversuche mit chimären Antikörpern gegen GD2 (Navid et al., 2010) und GD3 (Triozi et al., 2006) unternommen, sowie Immunisierungsversuche mit GM3-Mimetica am Tiermodell (Arcangeli et al., 2010).

Über Arbeiten, die GD3 als tumorassoziiertes Antigen nutzen, wird im Kapitel 1.3.3 „GD3 als Zielstruktur in der Tumorthherapie“ ausführlich berichtet.

Ganglioside erscheinen zum Teil auch in nicht zell-assoziiierter Form im Blutplasma, im Liquor cerebrospinalis sowie in Milch.

Sowohl in humaner als auch boviner Milch sind Ganglioside in relativ großer Menge zu finden, wobei der Gangliosidgehalt in humaner Milch höher ist als in Kuhmilch. Das Gangliosidspektrum der Milch verändert sich im Verlaufe der Laktation. Im Collostrum ist die Gesamtmenge an Gangliosiden höher als in reifer Milch. Zunächst überwiegt GD3, später sinkt der Gesamtgangliosidgehalt und GM3 wird Hauptbestandteil.

Tierexperimente zeigten, dass eine Versorgung mit Gangliosiden über die Nahrung für die frühe Hirnentwicklung notwendig ist (McJarow et al., 2009).

Außerdem dienen Ganglioside der Milch auch der Prävention von infektiösen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes. So wird das vakuolisierende Cytotoxin A von *Helicobacter pylori* durch die Bindung an Milchganglioside neutralisiert (Wada et al., 2010). Die Enterotoxine von *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae* sowie auch Viren können von Gangliosiden gebunden und somit deren Adhäsion im Darm blockiert werden.

Milchganglioside unterstützen die Ausbildung einer physiologischen Mikroflora, indem sie das Wachstum von Bifidobakterien unterstützen, während sie *Escherichia coli* inhibieren (Rueda, 2007).

Ganglioside spielen auch als Antigene bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Da Strukturen auf Bakterien vorkommen, die den Glycanstrukturen der körpereigenen Ganglioside ähneln, kann es durch diese molekulare Mimikry zur Bildung von autoreaktiven Antikörpern kommen.

Ein typisches Beispiel dafür ist das Guillain-Barré-Syndrom, dem oftmals eine Infektion mit *Campylobacter jejuni* vorausgeht.

Da eine molekulare Ähnlichkeit zwischen den Lipooligosacchariden von *C. jejuni* und den Gangliosiden GM1 und GD1a besteht, kommt es gelegentlich zur Bildung von Antikörpern, die auch an diese Ganglioside binden. Da diese Glycolipide wesentlicher Bestandteil peripherer motorischer Nerven sind, können diese Antikörper zum Bild einer neurologischen Autoimmunerkrankung beitragen, indem sie zum Beispiel die für die Anordnung der Ionenkanäle wichtigen Lipid-*rafts* beeinträchtigen (Yuki, 2010).

1.2 Sialinsäuren

Häufig werden die Begriffe *Sialinsäure* und *Neuraminsäure* als Synonyme verwendet. Guntar Blix und Ernst Klenk entdeckten unabhängig voneinander diese Gruppe von Aminosackern und bezeichneten diese Substanzen als Sialinsäure bzw. Neuraminsäure. Alfred Gottschalk klärte die Struktur auf und die drei Forscher einigten sich auf eine einheitliche Benennung (Blix, Gottschalk & Klenk, 1957). Nach dieser heute auch von der IUPAC festgeschriebenen Nomenklatur sollte der Begriff *Sialinsäure* als Oberbegriff für alle Derivate, *Neuraminsäure* hingegen immer im Zusammenhang mit genaueren Angaben über das Molekül verwendet werden.

Sialinsäuren sind anionische Ketosen mit 9 C-Atomen. Für die negative Ladung bei neutralem pH-Wert bzw. den sauren Charakter der Moleküle ist die am C-2-Atom gebundene Carboxylgruppe verantwortlich. Sialinsäuren kommen vor allem als Bestandteile von Gangliosiden und Glycoproteinen vor (Angata & Varki, 2002).

Durch die mögliche Substitution einer oder mehrerer funktioneller Gruppen kommt es zu einer großen strukturellen Vielfalt.

N-Acetyl-Neuraminsäure kann z.B. durch O-Acetylierung (Kamerling & Vliegenthart, 1975), De-N-Acetylierung (Hanai et al., 1988), durch Substitution der N-Acetylgruppe durch eine Hydroxylgruppe (Kitajima & Inoue, 1992) und durch Oxidation (Heckner & Strufe, 1956; Brenner et al., 2009) modifiziert werden.

Die biologische Wirksamkeit und Funktion der Derivate differiert sehr stark.

Da sich Sialinsäuren meist am distalen Ende von Glycanketten befinden, sind sie an zahlreichen Interaktionen beteiligt (Angata & Varki, 2002).

Die Oberfläche von Erythrozyten ist beispielsweise reich an Sialinsäuren. Durch die negative Ladung dieser Moleküle kommt es zu Abstoßungseffekten, die eine spontane Aggregation der Blutzellen verhindern. Die Halbwertszeit von Glycoproteinen hängt sehr stark vom Grad der Sialylierung ab. Sialinsäure schützt diese Makromoleküle vor der vorzeitigen Degradierung (Varki, 2008).

Die Interaktion von sialylierten Lewis^x - Antigenen der Granulozyten mit Selektinen der Gefäßendothelzellen im Bereich einer Entzündung ermöglicht die Diapedese der Granulozyten ins Gewebe (Jones et al., 1995).

Sialinsäuren spielen aber auch eine Rolle als Rezeptoren von Pathogenen und Toxinen.

So bindet zum Beispiel das Tetanustoxin über die Sialinsäuren der Ganglioside an Neuronen und führt letztlich zur unkontrollierten Freisetzung von Neurotransmittern (Varki, 2008).

Das Bakterium *Helicobacter pylori* nutzt ebenfalls die Sialinsäure als Rezeptor (Hirno et al., 1996).

Eine Infektion der Lunge mit sialidasehaltigen Viren kann die Voraussetzung für eine Sekundärinfektion mit opportunistischen bakteriellen Erregern sein, welche an Galactosereste binden. Die Galactosereste sind normalerweise nicht zugänglich, da sie durch Sialinsäure maskiert sind (Schauer, 2009).

Die zwei in der Natur am häufigsten vorkommenden Sialinsäurederivate sind die N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) und die N-Glycolyl-Neuraminsäure (Neu5Gc).

Neu5Gc unterscheidet sich von Neu5Ac durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe (Schauer, 2009).

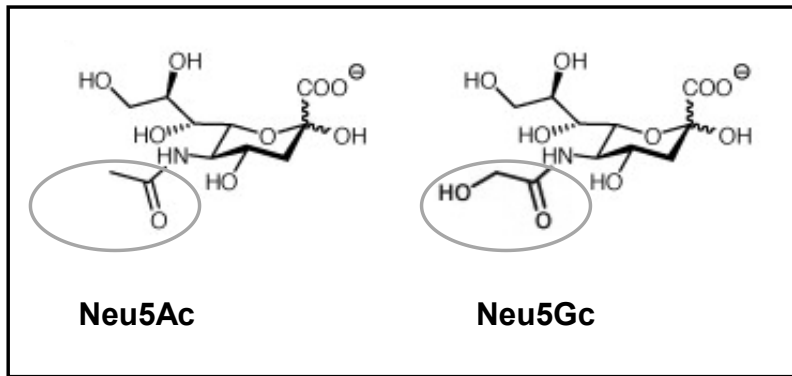


Abbildung 1.4: Strukturen der beiden häufigsten Sialinsäuren N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Glycolyl-Neuraminsäure

(modifiziert nach Schauer, 2009)

Die jeweils charakteristische N-Acetyl- bzw. N-Glycolyl-Gruppe ist grau eingekreist.

In den Geweben aller Wirbeltiere, außer dem Menschen kommen beide Varianten vor, wobei Neu5Gc meist überwiegt. Der Präkursor Neu5Ac wird weiter zu Neu5Gc hydroxyliert.

Dem Menschen fehlt die entsprechende Hydroxylase, welche selbst bei nah verwandten Primaten wie Schimpansen nachweisbar ist (Chou et al., 1998). Über die konkrete Wirkung dieser Veränderung im Verlaufe der Evolution wird bisher nur spekuliert. Möglicherweise konnte sich die Mutation durchsetzen, weil die homozygoten Individuen widerstandsfähiger gegenüber Neu5Gc-bindenden Pathogenen waren. Es existieren zum Beispiel Malariaerreger, die vorzugsweise Affen befallen (z.B. *Plasmodium reichenowi*), weil sie an Neu5Gc binden, während andere humanpathogen sind (z.B. *Plasmodium falciparum*), weil sie an Neu5Ac binden (Martin et al., 2005; Rich et al., 2009).

Neu5Gc, welche in Spuren im menschlichen Gewebe nachweisbar ist, stammt wahrscheinlich aus Sialinsäurequellen der Nahrung. Eine mögliche Immunogenität dieser Sialinsäurevariante für den Menschen wird diskutiert (Miwa et al., 2004; Varki, 2001).

Kuhmilch und die darin enthaltenen Ganglioside enthalten fast ausschließlich die Sialinsäure Neu5Ac (Spichtig et al., 2010).

Die Wirkung von Gangliosiden wird ganz entscheidend von der enthaltenen Sialinsäure beeinflusst.

Bereits 1988 wurde von Hanai et al. das Vorkommen von de-N-acetylierten Gangliosiden berichtet, ein de-N-acetyliertes GM3 wurde gefunden in A431-Zellen und in B16-Melanomzellen.

Später wurden Antikörper gegen synthetisch hergestellte Ganglioside mit de-N-acetylierter Sialinsäure produziert, die diese Ergebnisse bestätigten (Sjoberg et al., 1995). Die von dieser Arbeitsgruppe generierten monoklonalen Antikörper zeigten keine Reaktion mit den entsprechenden re-acetylierten Gangliosiden oder mit de-N-acetylierten Gangliosiden, die einer milden Perjodat-Behandlung unterzogen wurden.

Wird de-N-acGM3 Zellen exogen zugeführt, kommt es in den behandelten Zellen zur Phosphorylierung des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und die Zellproliferation wird verstärkt. Die Zugabe von GM3 mit intakter Sia führt dagegen zur Hemmung der Proliferation, speziell das EGF-abhängige Wachstum wird unterdrückt.

De-N-acGM3 ist neuraminidaseresistent und kann nur über den Umweg der re-N-Acetylierung zu intaktem GM3 mit anschließender Degradierung abgebaut werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Balance beider Moleküle bei der Kontrolle der Zellproliferation eine Rolle spielt (Hakomori & Igarashi, 1995).

Eine de-N-acetylierte Form von GD3 wurde in humanen Melanomen gefunden. Es machte 0,1% der Gesamtganglioside aus und zeichnete sich durch eine etwas kürzere Fettsäurekette aus, als sonst bei GD3 oder 9-O-acGD3 beobachtet wird (Popa et al., 2007). Die Funktion de-N-acetylierter Ganglioside ist bislang ungeklärt.

1.3 Das Disialogangliosid GD3

Das Disialogangliosid GD3 (CD60a) scheint sowohl in der gesunden Zelle als auch in der Tumorzelle von besonderer Bedeutung zu sein. Die genaue Funktion des Gangliosids GD3 konnte jedoch bisher nicht klar gezeigt werden (Ohkawa et al., 2010). Viele Arbeiten zu diesem Thema liefern einzelne Puzzleteile, von denen hier einige dargestellt werden sollen, auch wenn sie bislang noch kein zusammenhängendes Bild ergeben.

1.3.1 Vorkommen von GD3

Mehrere Arbeitsgruppen haben GD3 in Melanomgeweben nachgewiesen (Dippold et al., 1985; Ariga et al., 2008; Ohkawa et al., 2010; Lo et al., 2010).

Die Menge differierte stets sehr stark. Sogar die verschiedenen Metastasen eines Patienten, wiesen stark heterogene GD3-Gehalte auf (Dippold et al., 1985). GD3 konnte auch in einigen Nävi nachgewiesen werden, jedoch kaum in Melanozyten der gesunden Haut (Dippold et al., 1985; Hersey et al., 1988).

Neben Melanomen weisen auch andere transformierte Gewebe erhöhte GD3-Gehalte auf. So sind zum Beispiel neuroektodermale Tumore wie Neuroblastome und Gliome stark GD3 positiv. Auch bei Tumoren epithelialen Ursprungs wie Colon- und Pankreaskarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Metastasen von Bronchial- und Mammakarzinomen sowie bei akuten lymphatischen Leukämien enthalten die entarteten Zellen erhöhte Mengen GD3 (Lo et al., 2010). Besonders T-Lymphoblasten der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter sind stark GD3-haltig (Merritt et al., 1987).

Auch in Zellen der Dermis und im Interstitium des Gastrointestinaltraktes, in der Plazenta sowie in den interlobären Septen des Thymus konnte GD3 nachgewiesen werden (Dippold et al., 1985; Malisan & Testi, 2002).

Ein Teil der Zellen des Immunsystems enthält ebenfalls GD3. So ist zum Beispiel eine Subpopulation von etwa 10 % der T-Zellen GD3-positiv (Ren et al., 2001).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass GD3 im Zytoplasma aller T-Zellen des peripheren Blutes vorkommt, jedoch nur bei einem kleinen Teil auf der Oberfläche zu

finden ist. T-Zellen aus tonsillären Lymphknoten hingegen haben alle das Gangliosid auf der Oberfläche (Wipfler et al., 2011).

Der Anteil der GD3 auf der Oberfläche tragenden T-Zellen im peripheren Blut ist bei CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen etwa gleich hoch, ein erhöhter Anteil GD3-positiver T-Zellen ist unter den CD45RO⁺-T-Zellen vom memory-Zelltyp zu finden. Eine Stimulation mit PHA oder OKT3 erhöht den Anteil der GD3-positiven Zellen, die GD3-Ausprägung ist aber unabhängig von der Erhöhung von CD25, kann also nicht als direkte Konsequenz der Aktivierung gesehen werden (Merritt et al., 1996).

Darüber hinaus wird GD3 auch auf der Oberfläche von Basophilen und Mastzellen gefunden (Ren et al., 2001).

Geringe GD3-Gehalte kommen auch in den Pigmentzellen der Retina sowie in den Zellen des Nervensystems vor (Lo et al., 2010).

Im Gehirn des gesunden Erwachsenen findet man GD3 vor allem in Neuronen, in den Vorläuferzellen der Oligodendrocyten und in Astrocyten. Die Ausprägung in Astrocyten ist bei neuronalen Erkrankungen, wie zum Beispiel Multipler Sklerose enorm erhöht.

In maturen Oligodendrocyten und in Microgliazellen konnte GD3 nicht nachgewiesen werden (Marconi et al., 2005).

In Mausexperimenten wurde ermittelt, dass GD3 auf neuronalen Stammzellen vorkommt. Mit GD3 spezifischen Antikörpern können diese Zellen isoliert werden. Sie besitzen die Fähigkeit zu proliferieren und zu Neuronen, Astrocyten oder Oligodendrocyten zu differenzieren. Der GD3-Gehalt nimmt im Verlaufe der Differenzierung rapide ab (Nakatani et al., 2010).

Auch auf humanen embryonalen neuronalen Stammzellen wurde GD3 gefunden (Yanagisawa et al., 2011).

1.3.2 Biologische Wirkungen von GD3

GD3 spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion von Melanom- und Neuroblastomzellen an verschiedene Substrate wie Kollagen, Vitronectin, Laminin oder Fibronectin. Eine Inkubation dieser Tumorzellen mit GD3-spezifischen monoklonalen Antikörpern verhindert die Anheftung der Zellen an diese Substrate. Bereits angeheftete Zellen können sogar abgelöst werden. Den gleichen Effekt hat auch die hier bereits beschriebene milde Perjodat-Oxidation der Zellen (Cheresh et al., 1986).

Auch in einer späteren Arbeit von Ohkawa et al. wird gezeigt, dass GD3-positive Zellen eine stärkere Adhäsion an extrazelluläre Matrices wie zum Beispiel Kollagen Typ I und Typ IV zeigen als GD3-negative Zellen. In den glycolipidreichen Mikrodomänen der GD3-positiven Zellen fanden sich höhere Integrinkonzentrationen als in den Lipid-rafts der Kontrollzellen.

GD3 kann integrinvermittelte Signale verstärken, indem es für die Zusammenlagerung vieler Integrinmoleküle in den *lipid rafts* sorgt.

Die Koloalisation von GD3 mit Integrinen führt zu einem höheren Maß an Zelladhäsion und integrinvermittelten Signalen durch die Formierung von *Clustern*.

GD3 beeinflusst damit die Malignität dieser Tumorzellen (Ohkawa et al., 2010).

GD3 ist in der Lage, Gliomazellen zur Freisetzung von vaskulärem Endothelwachstumsfaktor (VEGF) zu veranlassen, was die Neubildung von Gefäßen im Tumorgewebe fördert (Koochekpour et al., 1996).

Dies wurde im Tierversuch an Nacktmäusen bestätigt. Im Vergleich zu Tieren, denen neuronale Tumorzellen mit intakter GD3-Synthase implantiert wurden, zeigten Tiere, denen Tumorzellen mit GD3-Synthase-Knock-Out implantiert wurden, ein wesentlich vermindertes Tumorstadium mit minimaler Angiogenese (Zeng et al., 2000).

GD3 in humanen Melanomzellen ist in der Lage, die Proliferation zu fördern und damit die Malignität der Tumore zu erhöhen.

Hamamura et al. verglichen eine mutierte Melanomzelllinie, welcher die Fähigkeit zur GD3-Synthese fehlte, mit der transfizierten GD3-positiven Form dieser Zelllinie. Beobachtet wurde, dass GD3-positive Melanomzellen eine stärkere Tyrosin-Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK), sowie von p130CAS und Paxillin (beide Moleküle fördern Wachstum und Invasivität) aufweisen, wenn sie mit FCS behandelt werden, als Zellen ohne GD3 (Hamamura et al., 2005; Hamamura et al., 2007).

GD3 kann den programmierten Zelltod vermitteln. Nach der Stimulation von CD95 oder der Kopplung von TNF- α kommt es zu einer massiven Anreicherung von GD3 in der Zelle. Dieses GD3 wird aus Ceramid aufgebaut, welches zum großen Teil aus dem Abbau von Sphingomyelin aus der Plasmamembran durch die saure Sphingomyelinase bereitgestellt wird. Wird die GD3-Anreicherung in der Zelle

unterbunden, zum Beispiel durch Inhibition der GD3-Synthase, kommt es nicht zur Apoptose.

GD3 bewirkt am Mitochondrium einen Verlust des Membranpotentials der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Verlust des Protonengradienten führt zu einem Verlust von Calciumionen aus den Mitochondrien und zur Einstellung der oxidativen Phosphorylierung.

Die Mitochondrien schwellen an und platzen letztlich, wobei sie Faktoren aus ihrem Inneren freisetzen, wie zum Beispiel reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Cytochrom C, Apoptose induzierenden Faktor (AIF), mitochondriale Caspasen und ATP (Rippo et al., 2000). Diese Produkte führen zur Aktivierung weiterer Caspasen im Zytoplasma und leiten die apoptotischen Vorgänge am Zellkern ein (Malisan & Testi, 2002; Higuchi et al., 2005).

Die GD3 vermittelte Apoptose wird auch als Mechanismus des β -Amyloid - bedingten neuronalen Zelltodes bei Morbus Alzheimer betrachtet (Kim et al., 2010). Darüber hinaus scheint GD3 die β -Amyloid Produktion direkt anzuregen (Grimm et al., 2012).

In unbehandelten Hepatozyten von Ratten findet man GD3 auf der Oberfläche sowie in den Membranen von ER und Golgiapparat. Werden die Zellen mit TNF- α behandelt oder radioaktiv bestrahlt, verschwindet GD3 von der Zelloberfläche. Das Gangliosid tritt dann kolokalisiert mit den frühen und späten Endosomen auf und wird abhängig vom Actinskelett zu den Mitochondrien transportiert. Blockiert man die GD3-Neosynthese durch Cyclosporin A oder zerstört man das Cytoskelett mit Latrunculin A oder Filipin, kommt es nicht zur Anreicherung von GD3 an den Mitochondrien und in der Konsequenz nicht zur Apoptose (Garcia-Ruiz et al., 2002).

Eine Stunde nach dem Apoptose auslösenden Stimulus kann GD3 an den Mitochondrien nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten ist GD3 dann auch im Zellkern zu beobachten. Die Mitochondrien entwickeln während der Apoptose *raft*-ähnliche Bereiche und fragmentieren. Diese als small-mitochondria abgegebenen Strukturen gelangen zum Zellkern (Garofalo et al., 2007).

Die Kolokalisation von GD3 mit dem Zellkern wurde auch von anderen beobachtet. Eine Interaktion mit Histon H1 und die Beeinflussung der Transkription apoptoserelevanter Genabschnitte wird vermutet (Tempera et al., 2008).

Über den mitochondrial vermittelten Weg hinaus, kann das Gangliosid GD3 die Apoptose auch durch Unterdrückung der Überlebenssignale durch NFκB auslösen (Colell et al., 2001). Tumorzellen, die sich durch das Heraufregulieren von NFκB - abhängigen Genen der Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen oder Zytostatika entziehen, können durch eine Vorbehandlung mit GD3 für diese Auslöser sensitiviert werden (Paris et al., 2002).

GD3, welches von Tumoren freigesetzt wird, ist in der Lage aktivierte T-Zellen in die Apoptose zu bringen. Ruhende T-Lymphozyten werden von diesem Mechanismus nicht erfasst. Die Apoptose der aktivierten T-Zellen kann mit Bonkreischer Säure, Cyclosporin A und mit Antioxidantien aufgehoben werden (Sa et al., 2009).

Ähnliche Effekte wurden auch mit weiteren von Nierenzellkarzinomen freigesetzten Gangliosiden beobachtet. Die Apoptoseinduktion in aktivierten T-Zellen, kann durch das Abfangen der Ganglioside mit Hilfe spezifischer Antikörper verhindert werden (Biswas et al., 2009).

Ein weiterer Tumorevasionsmechanismus wird von Webb et al. beschrieben. Von Tumorzellen freigesetztes Gangliosid GD3 kann über die Bindung an CD1b die Aktivität von NK-T-Zellen inhibieren (Webb et al., 2012).

1.3.3 GD3 als Zielstruktur in der Tumorthherapie

Da das Gangliosid GD3 häufig verstärkt auf Tumorzellen von Melanomen und Neuroblastomen vorkommt, wurden bereits zahlreiche Versuche einer Nutzung dieser Struktur als Angriffspunkt in der Krebstherapie unternommen.

Mit GD3 spezifischen monoklonalen Antikörpern konnte die Proliferation von Melanom- und Gliomzellen *in vitro* gehemmt werden (Dippold et al., 1984; Hedberg et al., 2000).

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass der murine GD3-spezifische Antikörper R24 zur Aktivierung von Komplement führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Anwachsen von Tumoren bzw. Metastasen deutlich reduziert ist, wenn die Tiere mit R24 behandelt wurden (Cheresh et al., 1985; Hellström et al., 1985; Honsik et al., 1986).

Der murine Antikörper R24 wurde bereits 1988 in einer klinischen Phase I Studie der amerikanischen Arbeitsgruppe um Vadhan-Raj und Houghton getestet.

Die Antikörperinfusionen wurden von den 21 Studienteilnehmern mit GD3-positiven Melanomen und Metastasen in den meisten Fällen gut vertragen, Nebenwirkungen wie Urtikaria, Juckreiz sowie Übelkeit und Durchfälle konnten durch die Gabe von Antihistaminika eingedämmt werden. Bei vier Patienten konnte ein teilweiser Rückgang des Tumorgewebes beobachtet werden, bei sechs Patienten wurde zumindest eine Stabilisierung für einige Wochen erreicht.

Im Bereich der Tumore konnte eine Entzündung induziert werden. Diese war durch die Einwanderung von Mastzellen und T-Zellen in das Tumorgewebe sowie durch erhöhte Gehalte der Komplementkomponente C9 in den Tumoren gekennzeichnet. B-Zellen oder Makrophagen wurden in den Tumoren nicht beobachtet.

20 von 21 Patienten entwickelten IgG Antikörper gegen R24, was die Wirksamkeit einer weiteren Behandlung mit R24 stark herabsetzte.

Ein weiteres Problem der ausschließlichen Behandlung mit anti-GD3-Antikörpern ist außerdem, dass es nach einiger Zeit zur Selektion GD3 negativer Klone der Tumorzellen kommt. Nach Beendigung der Therapie entstehen aus diesen wieder GD3-positive Zellen.

Niedrigere Dosen des Antikörpers scheinen bessere Effekte zu erzielen als sehr hohe Gaben. Als mögliche Ursachen dafür wurden zum einen die unerwünschte Aktivierung von Komplement in den Gefäßen und damit eine Verminderung der zur Verfügung stehenden Komplementkomponenten diskutiert. Zum anderen kommen eine systemische Entzündungsreaktion, die zur Herabregulation der Inflammation im lokalen Bereich des Tumors führt sowie die komplementabhängige Lyse von GD3-positiven T-Zellen als Ursachen in Frage (Vadhan-Raj et al., 1988).

Im Gegensatz zu den zunächst vielversprechenden Ergebnissen konnte in einer weiteren klinischen Studie 1998 jedoch kein Benefit für die Patienten erzielt werden. Vor allem bei höherer Dosierung wurde eine starke Toxizität des Antikörpers R24 beobachtet. Es kam zu einem signifikanten Abfall der Zahl der peripheren Lymphozyten und zu einer Verminderung der Serumalbuminkonzentration der Patienten. Ein Patient verstarb während der Behandlung (Maguire et al., 1998).

Weitere Studien konnten die Behandlungsergebnisse durch zusätzliche Gabe von GM-CSF, IL-2 und TNF α verbessern (Kemminer et al., 2001).

Um die Nachteile von murinen Antikörpern zu überwinden, wurden mittlerweile GD3 spezifische chimäre Antikörper mit humanem Fc-Teil erzeugt.

Die Effekte des murinen R24 sowie des chimären anti-GD3-Antikörpers KW-2871 wurden *in vitro* getestet und verglichen. Zellen der humanen Melanomzelllinie Mel-624 wurden als Zielzellen und Lymphozyten des peripheren Blutes als Effektorzellen eingesetzt. Beide Antikörper waren in der Lage ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) und CMC (*complement-mediated cytotoxicity*) zu induzieren, wenn sie vor der Zugabe der Effektorzellen zu den Zielzellen gegeben wurden. Während R24 zu einer starken Proliferation der Lymphozyten und verstärkter Zytokinexpression von IL-4, IL-10 und IFN- γ *in vitro* führte, zeigte der chimäre Antikörper keinen dieser Effekte. Die Autoren erwarten daher für KW-2871 eine geringere Toxizität und eine geringere Wahrscheinlichkeit des Auftretens schwerer akuter Infusionsreaktionen *in vivo* (Triozi et al., 2006).

Mit GD3 spezifischen chimären Antigenrezeptoren (CARs) armierte T-Zellen wurden erfolgreich *in vitro* sowie im Tiermodell gegen GD3+ Tumore eingesetzt. Die auf diese Weise veränderten T-Zellen konnten expandiert werden, zeigten bei Kontakt mit GD3-positiven Tumorzellen eine verstärkte Zytokinproduktion und führten zu spezifischer Lyse der Zielzellen. Erwartungsgemäß zeigten sich T-Zellen, die mit CARs der „zweiten Generation“ beladen waren effektiver, als T-Zellen mit CARs der „ersten Generation“. Im Unterschied zu diesen enthalten CARs der „zweiten Generation“ neben dem antigenspezifischen *single chain* Fragment und einer CD3 ζ - Signaldomäne zusätzlich eine intrazelluläre CD28 - Domäne. Diese liefert der T-Zelle bei Antigenkontakt ein kostimulatorisches Signal, welches verhindert, dass die T-Zelle anergisiert wird.

Das Wachstum von in Nacktmäuse implantierten Tumoren aus GD3-positiven Melanomzellen konnte mit CAR-tragenden T-Zellen gehemmt und das Tumolvolumen reduziert werden. Eine zusätzliche Gabe von IL-2 erwies sich dabei als vorteilhaft. Obwohl auch andere Gewebe GD3 enthalten, wurden keine negativen Nebenwirkungen beobachtet (Lo et al., 2010). Auf die Tatsache, dass ein Teil der T-Zellen selbst GD3-positiv ist, wurde in den Ausführungen nicht eingegangen.

In einer neueren Untersuchung der argentinischen Arbeitsgruppe um Jose L. Daniotti wurde die Möglichkeit der Nutzung des Glycolipids GD3 als Zielstruktur für ein

therapeutisches *drug delivery* System unter Verwendung des Antikörpers R24 beleuchtet. Die Forscher hatten beobachtet, dass der GD3-spezifische Antikörper nach der Bindung an sein Antigen von Tumorzellen sehr schnell internalisiert wird (Iglesias-Bartolomé et al., 2006). Für die therapeutische Nutzung des Komplementsystems oder von Effektorzellen des Immunsystems ist dies ein großer Nachteil. Dagegen bietet diese Eigenschaft die Möglichkeit, zytotoxische Substanzen in die Zelle zu schleusen. In der 2013 vorgelegten Studie wurde das ribosomeninaktivierende Toxin Saporin mit R24 gekoppelt. GD3-positive Zellen und ihre GD3-freien Pendanten wurden mit diesem Komplex *in vitro* behandelt. Es zeigte sich deutlich, dass nur GD3-positive Zellen von den zytotoxischen Effekten durch Saporin betroffen waren (Torres Demichelis et al., 2013).

Noch im Stadium des Tests in Zellkultur- und Tierversuchen befindet sich der Einsatz von anti-p130Cas- und anti-Paxillin-siRNAs. Die Beobachtung, dass vor allem GD3-positive Zelllinien die Moleküle p130Cas und Paxillin besonders stark ausprägen und diese für Invasivität und Zellwachstum verantwortlich erscheinen, macht diese Therapieoption für Melanome attraktiv, die in der Mehrzahl hohe GD3-Gehalte aufweisen. In *in vitro*-Versuchen und Xenograft-Modellen mit GD3-positiven SK-Mel-28-Zellen wurde dies erfolgversprechend angewendet (Hamamura et al., 2005; Makino et al., 2016).

1.3.4 Modifikationen der Sialinsäure von GD3

1.3.4.1 9-O-Acetylierung der terminalen Sialinsäure von GD3

Die terminale Sialinsäure von Gangliosiden kann O-acetyliert werden. Besonders im Zusammenhang mit GD3 wurde zu diesem Vorgang ausgiebig geforscht.

Prinzipiell ist eine O-Acetylierung der Sialinsäure an allen Hydroxylgruppen des Moleküls möglich, bisher wurden jedoch nur die Produkte 9-O-acetyl-GD3 (CD60b) und 7-O-acetyl-GD3 (CD60c) nachgewiesen. 7-O-acetyl-GD3 wird unter physiologischen Bedingungen in die 9-O-acetylierte Variante umgelagert (Angata & Varki, 2002).

Durch die zusätzliche Acetylgruppe nimmt die Polarität des Moleküls ab, was sich in der stärkeren Mobilität bei der Chromatographie an Kieselgel zeigt (Reuter & Schauer, 1994).

9-O-acGD3 kommt in den Geweben des gesunden erwachsenen Menschen nur in sehr geringem Umfang vor. Es ist beschränkt auf Gewebe wie Kleinhirn und Retina (Chen & Varki, 2002). Darüber hinaus enthalten Subpopulationen der T-Zellen und der Granulozyten nennenswerte Mengen 9-O-acGD3 (Knip et al., 1993).

In Melanomen und Basalzellkarzinomen konnten dagegen hohe Gehalte nachgewiesen werden (Heidenheim et al., 1995).

Die proapoptotische Aktivität von GD3 wird durch die O-Acetylierung aufgehoben (Malisan et al., 2002). Tumorzellen können sich so vor Apoptose schützen. Wird 9-O-acGD3 zu GD3 de-O-acetyliert, ist die proapoptotische Aktivität des Moleküls wieder hergestellt (Knip et al., 2006).

Die Arbeitsgruppe von Birks konnte dies an Glioblastomzellen aus Biopsie-Material bestätigen. Zellkulturen aus diesem Material zeigten intrazellulär sowohl GD3 als auch 9-O-acGD3. Die Abspaltung der Acetylgruppe mittels Hämagglutininesterase führte zu einer Umwandlung des 9-O-acGD3 in GD3. Dies resultierte in einer geringeren Überlebensfähigkeit der Tumorzellen. Astrocyten blieben von der Behandlung unbeeinflusst. Die klinische Anwendung eines rekombinanten Baculovirus, welches die Hämagglutininesterase enthält, wird als adjuvanter therapeutischer Ansatz diskutiert (Birks et al., 2011).

In reifen Erythrozyten jedoch führt 9-O-acGD3 zu einem der Apoptose ähnlichen Prozess mit Membranveränderungen wie dem nach außen Verlagern von Phosphatidylserin, der Bildung von Vesikeln sowie der Aktivierung von Caspasen (Mukherjee et al., 2007). Da diese Zellen weder Zellkern noch Mitochondrien besitzen, muss hier ein Mechanismus angenommen werden, der ohne diese Organellen auskommt. Möglicherweise erfolgt ein Abbau des acetylierten GD3 zu Ceramid, welches auf verschiedenen Wegen proapoptotisch wirken kann.

1.3.4.2 Oxidation der terminalen Sialinsäure von GD3

Bereits 1956 wurde durch Fritz Heckner und Reimer Strufe ein cytochemischer Polysaccharidnachweis mit Natriumperjodat (NaIO_4) beschrieben.

Die Autoren stellten fest, dass Perjodsäure an Glycanen nicht zu einer unspezifischen Oxidation mit dem Auftreten von Form- und Acetaldehyd führt, sondern zur Entstehung von polymeren Aldehyden.

Dabei reagiert die Perjodsäure mit den α -Glycolylgruppen von Kohlenhydraten wie zum Beispiel Glycogen. Es kommt zur Aufspaltung der C-C-Bindung und zur Oxidation der sekundären Alkoholgruppen zu Aldehydgruppen. Dabei kommt es nicht zu einer Aufspaltung der Glycosyl- und Halbacetalbindungen und damit auch nicht zur Entstehung von wasserlöslichen, niederen Aldehyden (Heckner & Strufe, 1956).

Eine radioaktive Nachweismethode von Sialinsäuren nutzt ebenfalls die Eigenschaft von Na-Perjodat, die Sialinsäure selektiv an der glycerinartigen Seitenkette zwischen dem 7. und dem 8. Kohlenstoffatom zu spalten. Die entstehende Aldehydgruppe wird mit radioaktiv markiertem Na-Borhydrid reduziert und damit die Sialinsäure nachgewiesen (Van Lenten & Ashwell, 1971; Gahmberg & Andersson, 1977).

Ein erster massenspektrometrischer Nachweis eines Sialinsäurealdehyds mit einer Aldehydgruppe am 7. Kohlenstoffatom wurde 1989 geführt (Murray et al., 1989).

Auch im Fall des Gangliosides GD3 kann die exocyclische glycerinartige Seitenkette der terminalen Sialinsäure oxidiert werden. Dabei werden die Kohlenstoffatome 8 und 9 abgespalten und es entsteht eine Aldehydgruppe am C7-Atom.

Die Entstehung von GD3-7-al bei der Behandlung von GD3 mit Natriumperjodat konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Brenner et al., 2009).

Das chromatographische Laufverhalten von GD3 und seinem oxidierten Derivat unterscheidet sich nicht, eine Differenzierung zwischen beiden Molekülen ist nur über die Overlay-Färbung mit einem spezifischen Antikörper möglich.

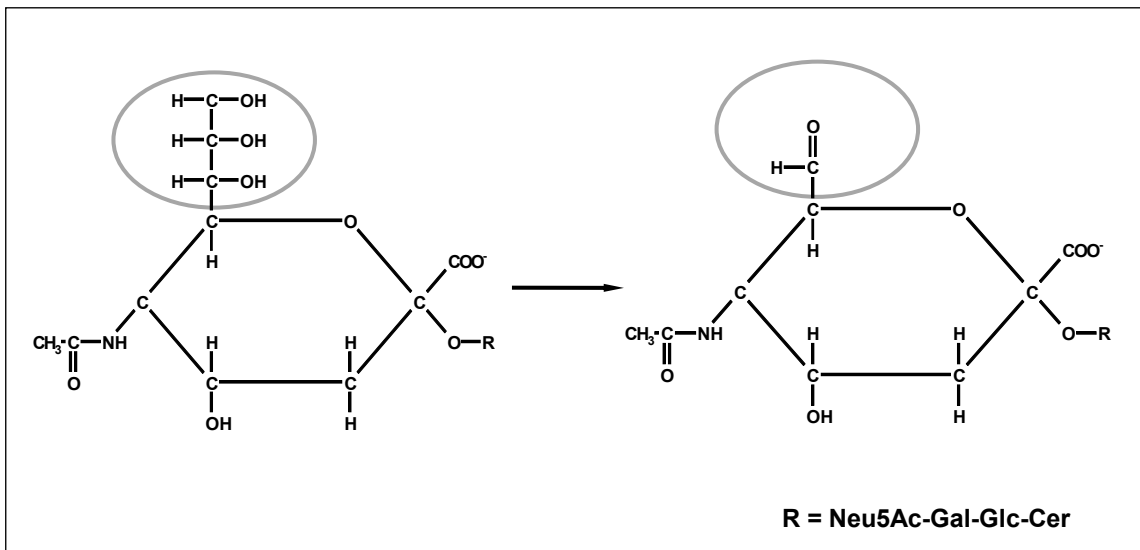


Abbildung 1.5: Veränderungen an der terminalen N-Acetylneuraminsäure von GD3 bei der Oxidation mit Natriumperjodat.

Die glycerinartige Seitenkette (grau eingekreist) wird zwischen dem 7. Und 8. Kohlenstoffatom abgetrennt und es entsteht eine Aldehydgruppe am 7. Kohlenstoffatom.

Für viele Substanzen ist bekannt, dass schon geringe chemische Modifikationen zu massiven Änderungen der biologischen Wirkung führen. Auch für die Stoffgruppe der Ganglioside wurden derartige Effekte beobachtet. Vor allem die in Gangliosiden enthaltene Sialinsäure beeinflusst die Wirkung der Moleküle sehr stark.

So entsteht beispielsweise aus dem proapoptotisch wirksamen Gangliosid GD3 durch 9-O-Acetylierung eine apoptoseprotektive Variante des Moleküls.

Tumorzellen können sich auf diese Weise dem programmierten Zelltod entziehen (Kniep et al., 2006).

Beim Versuch der Aufklärung dieses Phänomens und bei der Suche nach möglichen Ansätzen zur Wiederherstellung der Apoptosesensitivität von Tumorzellen wurde die neue Stoffgruppe der oxidierten Ganglioside entdeckt. Ein Vertreter dieser neuen Stoffgruppe ist GD3-7-al.

An isolierten Mitochondrien erwies sich GD3-7-al als wirksamerer Induktor der Membrandepolarisation, als GD3 selbst. Proteoliposomen, in deren Membran das Protein Adenosin Nukleotid Translocase (ANT), ein Bestandteil des Permeabilisierungs-Transitions-Poren-Komplexes (PTPC), eingebaut wurde, zeigten eine starke Kanalbildung nach der Inkubation mit GD3-7-al (Brenner et al., 2009).

1.4 Zielstellung

Das Gangliosid GD3 ist als tumorassoziiertes Antigen auf der Oberfläche neuroektodermaler Tumore sowie als proapoptotisch wirkender Lipidmediator beschrieben. Der genaue Wirkmechanismus des Moleküls in der Apoptoseinduktion ist bisher jedoch unbekannt.

Vorversuche ergaben Hinweise, dass nicht GD3 selbst, sondern sein oxidiertes Derivat GD3-7-al das eigentliche Effektormolekül darstellt.

Eine minimale Veränderung des GD3-Moleküls, die 9-O-Acetylierung der Seitenkette der terminalen Sialinsäure, hebt die proapoptotische Wirkung des Gangliosids auf. Tumorzellen, in denen das Enzym 9-O-Acetyltransferase aktiv ist, können der Apoptose auf diese Weise entgehen. Diese Form der Apoptosehemmung ist theoretisch nicht mehr möglich, wenn GD3 als Aldehyd vorliegt, da die acetylierbaren Strukturen bei der Oxidation verloren gehen.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, Vorkommen und Funktion des oxidierten GD3-Derivates zu untersuchen. Dabei war zu analysieren, welche Auswirkungen oxidiertes GD3 auf die Apoptoserate von GD3-resistenten Tumorzellen hat.

Das Vorkommen, der bis dahin nur artifiziell generierten Substanz GD3-7-al, in biologischen Systemen war zu untersuchen. Es sollte geprüft werden, ob GD3-7-al in Primärzellen und Geweben auftritt. Dabei war zu klären, ob GD3-7-al unter Bedingungen des oxidativen Stresses entstehen und auf der Zelloberfläche oder intrazellulär induziert werden kann.

Es sollte betrachtet werden, welche neuen immunologischen Therapieansätze zur Behandlung resistenter Tumore unter Nutzung von GD3-7-al möglich wären.

Voraussetzungen für die Experimente dieser Arbeit und für nachfolgende Forschungsfragen sind zuverlässige Nachweismöglichkeiten der Metabolite GD3, 9-O-acGD3 und GD3-7-al. Während für den Nachweis von GD3 und 9-O-acGD3 bereits monoklonale Antikörper zur Verfügung standen, sollte für die Detektion von GD3-7-al im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein monoklonaler Antikörper gegen ein oxidiertes Gangliosid generiert und charakterisiert werden. Für die Selektion antikörperproduzierender Zellen war eine neue Screeningmethode zu etablieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Materialien

2.1.1.1 Patientenproben

Humane mononukleäre Zellen aus peripherem Blut wurden aus dem Leukozytenfilm von Blutspenden des Deutschen Roten Kreuzes oder aus Vollblut gesunder Spender durch Ficoll-Gradienten isoliert.

Durch Leukapherese von Patienten gewonne AML-Blasten wurden uns von Herrn Prof. Dr. med. Bornhäuser, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Bereich Stammzelltransplantation zur Verfügung gestellt.

Das Gewebe für die immunhistologischen Färbungen wurde uns vom Institut für Pathologie durch Herrn PD Dr. med. Michael Muders aus Schnellschnitten im Rahmen von Tumorsektionen bereitgestellt.

Spender und Patienten gaben nach erfolgter Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung. Die Gewinnung und Nutzung des Probanden- und Patientenmaterials wurde durch die lokale Ethikkommission der Medizinischen Fakultät „Carl-Gustav-Carus“ der TU Dresden genehmigt (Aktenzeichen: 27022006; 195092004).

2.1.1.2 Versuchstiere

3 Mäuse C3H x Balb/c F1

Die Nutzung der Tiere erfolgte nach Genehmigung des Tierversuchsvorhabens mit dem Titel „Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene auf menschlichen Leukozyten, rekombinante Proteine und Kohlenhydrate“ (Aktenzeichen: 24(D)-9168.24-1/2007-13).

2.1.1.3 Zelllinien und Hybridome

Tabelle 2.1: Übersicht der eingesetzten Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Name	Ursprung	Wachstum	Bezugsquelle
Capan-1	HTB-79	Pankreas-adenokarzinom	adhärent	ATCC
HEp-2	CCL-23	Larynxkarzinom	adhärent	ATCC
HL60	CCL-240	Promyeloblastische Leukämie	Suspension	ATCC

Jurkat Subtyp von Dr. Kniep	TIB-152	Akute T-Zell- Leukämie	Suspension	Dr. Bernhard Kniep
Ma-Mel-11		Melanom	adhärent	Prof. Eichmüller; DKFZ Heidelberg
Ma-Mel-95		Melanom	adhärent	Prof. Eichmüller; DKFZ Heidelberg
Molt-4	CRL-1582	Akute lymphoblastische T- Zell-Leukämie	Suspension	ATCC
PC3	CRL-1435	Prostata Adenokarzinom	adhärent	ATCC
SK-Mel-23		Melanom	adhärent	Prof. Eichmüller; DKFZ Heidelberg
T47D	HTB-133	Duktales Karzinom der Brust	adhärent	ATCC

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Hybridome

Hybridom R24

Überlassung von Prof. Schwartz-Albiez,
DKFZ Heidelberg

Hybridom M-T6004

Institut für Immunologie Dresden

2.1.2 Reagenzien, Antikörper und Enzyme

Tabelle 2.3: Übersicht der Reagenzien, Antikörper und Enzyme

Anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase- konjugiert	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Anti-Maus IgG/IgM, Alkalische Phosphatase- konjugiert	Merck, Darmstadt
Anti-Maus IgG/IgM/IgA, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-Maus IgM, Alkalische Phosphatase- konjugiert	Merck, Darmstadt
Anti-Maus IgG, biotinyliert	Dianova, Hamburg
Anti-Gangliosid-IgG/M-LINA	Attomol, Bronkow

Aquatex® wässriges Eindeckmittel	Merck, Darmstadt
CD14-Antikörper, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD14-Antikörper, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD20-Antikörper, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD20-Antikörper, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD3-Antikörper, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD3-Antikörper, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD56-Antikörper, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD56-Antikörper, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD83-Antikörper, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD86-Antikörper, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Cell Wash	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Dako Dual Endogenous Enzyme Block	Dako Deutschland, Hamburg
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DCFDA	Invitrogen, Carlsbad, USA
Depletionskits von Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec, Auburn USA
Eindeckmedium mit DAPI für die indirekte Immunfluoreszenz	Generic Assays GmbH, Dahlewitz
Euroimmun Objektträger (Gewebe-Mosaik; ethanolfixierte Granulozyten)	Euroimmun AG, Lübeck
GA Objektträger ANA (HEp-2)	Generic Assays GmbH, Dahlewitz
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Gangliosidstandards	Überlassung von Dr. Kniep, Institut für Immunologie, Dresden
Gangliosid-Line-Assay (in Entwicklung)	Attomol GmbH, Lipten
HAT Media Supplement	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes	Biochrom AG, Berlin
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histopaque®-1119	Sigma-Aldrich, Steinheim
HT Media Supplement	Sigma-Aldrich, Steinheim
IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody	
Isotyping Kit	Roche, Mannheim
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung 0,1%	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Maus-Normalserum	Überlassung von Frau Christine Gräfe, Institut für Immunologie

MDC-8-Antikörper	Überlassung von Prof. Schmitz, Institut für Immunologie, Dresden
MACS MicroBeads	Miltenyi Biotec, Auburn USA
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Auburn USA
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin
Orthoclone OKT3® (Muromonab-CD3)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	Serva, Heidelberg
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Saponin	Merck, Darmstadt
Streptavidin-HRP-Komplex	Dako, Hamburg
Trypanblau 0,5%	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Sigma Adjuvant System ®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.4: Übersicht der eingesetzten Chemikalien

BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat)	Gerbü Biotechnik, Gaiberg
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEAE-(Diethylaminoethyl-)Sephacrose	Pharmacia, Freiburg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Glycin	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Hexan-Isomerengemisch	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LiChroSorb Silica 60 Kieselgel	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid – Hexahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (Thioethylenglycol)	Ferak, Berlin
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Natriumperjodat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Orcin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin
Plexigum P28 (Polyisobutylmethacrylat)	Röhm & Haas, Darmstadt
Primulin	Aldrich, Milwaukee, USA
SepPak TM RP18 Material	Waters, Milford, USA
Toluol	Merck, Darmstadt
Tween 21	ICI, Middlesbrough, Großbritannien
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt

2.1.4 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2.5: Übersicht der Geräte und Hilfsmittel

Abdeckfolie easy seal	Greiner, Frickenhausen
Absauganlage	Vacuubrand, Wertheim
Analysen- und Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Aqua dest.	Institut für Immunologie, Hausversorgung
AutoMACS®	Miltenyi Biotec, Auburn USA
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Büchner-Trichter	Schott, Mainz
Chromatographiepapier	Whatman
Densitometer TLC-Scanner CS9001-PC	Shimadzu Corporation, Duisburg
Dialyseschlauch Spectrapor	
MWCO 6000 – 8000	Spectrum, Breda, Niederlande
Dosierapparatur mit Microliterspritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Drehschiebermembranhybridpumpe RC-5	Vacuubrand, Wertheim
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Durchflusszytometer FACS-Scan	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Durchflusszytometer Messröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Exsikkator	Desaga, Heidelberg
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar	Greiner, Frickenhausen
Fluoreszenzmikroskop AKLIDES	Medipan, Berlin
Gasbrenner fireboy	Integra Biosciences, Fernwald

Glasflaschen Duran	Schott, Mainz
Glassäulen Produran	Schott, Mainz
Helium	Institut für Immunologie, Hausversorgung
HPTLC-Platten Si60, Aluminium	Merck, Darmstadt
HPTLC-Platten Si60; Glas	Merck, Darmstadt
Kryo Einfrierröhrchen Nalgene	Nalge Company, Rochester, USA
Kryo Freezing Container Nalgene	Nalge Company, Rochester, USA
Laufmittel- und Beschichtungstanks	Desaga, Heidelberg
Magnetrührer Combimag RCO	IKA, Schaffhausen, Schweiz
Membranpumpe für Rotationsverdampfer	Vacuubrand, Wertheim
Microtom Leica CM1900	Leica Biosystems, Buffalo Grove, USA
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Jena
Parafilm M	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pasteurpipetten Glas	VWR TM International, Darmstadt
Phasenkontrastmikroskop Olympus CK 2	Olympus, Tokio, Japan
Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen (14 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Polystyrol-Spitzbodenplatten	Greiner, Frickenhausen
Polystyrol-Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Pyrexspitzgläschen	Pyrex, Frankreich
ReactiVap 3	Pierce, Rockford, USA
ReactiTherm 3	Pierce, Rockford, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rotationsverdampfer Laborota 4000	Heidolph, Schwabach
Software CellQuestPro	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Software WinMDI	Joe Trotter
Software AxioVision	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Spitzkolben	Schott, Mainz
StarFrost-Adhäsiv-Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Sterilbank CLAN LAF	Claus Damm, Højvangen, Dänemark
Sterilfilter Steritop	Millipore Corporation, Bedford, USA
Stickstoff	Institut für Immunologie, Hausversorgung
Trockeneis	Institut für Immunologie, Hausversorgung
Trockenschrank	Heraeus, Hanau

Ultraschallbad Sonorex Super RK103H	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad Sonorex Super RK514	Bandelin, Berlin
UV-Bestrahlungsgerät BioLink BLX-254	AGS, Heidelberg
Wippschüttler	Heidolph, Schwabach
Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit Kamera Zeiss AxioCam Mrm	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Zentrifuge Cytospin 3 mit Zubehör (Shandon Cytoclip, Cytofunnel, Shandon Filtercards, Objektträger)	Shandon, Pittsburgh, USA
Zentrifuge Rotina 35	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa 120 RS	Hettich, Tuttlingen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.1.1 Kulturmedien

Zur Kultivierung der Zelllinien und Hybridome wurde das Kulturmedium RPMI 1640 verwendet. Das im Folgenden als Standardmedium bezeichnete Medium wurde mit folgenden Zusätzen supplementiert:

- 10 % FCS (vor Gebrauch 40 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert)
- 1 % nicht essentiellen Aminosäuren
- 1 mM Natriumpyruvat
- 2 mM L-Glutamin
- 100 µg / ml Streptomycin
- 100 U / ml Penicillin
- 5 % Hepes

Für die Anzucht von Hybridomen wurden dem Standardmedium zusätzlich 25 nM Mercaptoethanol und 300 U / ml Interleukin-6 zugesetzt (Hybridom-Anzuchtmedium). Zur Erhaltung der Hybridomkulturen wurde die Interleukin-6-Menge dann auf 150 U / ml reduziert (Hybridom-Erhaltungsmedium).

Zur Selektion fusionierter Milz-Myeloma-Zellen wurde dem Hybridom-Anzuchtmedium Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Media Supplement von Sigma nach Angaben des

Herstellers zugesetzt (HAT-Medium). Die resultierende Endkonzentration der Zusätze im HAT-Medium betrug 100 μM Hypoxanthin, 0,4 μM Aminopterin und 16 μM Thymidin. Auf das HAT-Medium folgend wurde Hybridom-Anzuchtmedium supplementiert mit Hypoxanthin-Thymidin von Sigma (HT-Medium) mit einem Gehalt von 100 μM Hypoxanthin und 16 μM Thymidin eingesetzt.

Nach Zugabe der Zusätze wurden die Medien mit der Vakuumabsauganlage durch einen Sterilfilter in die autoklavierten Mediumflaschen filtriert.

2.2.1.2 Zellkulturtechnik

Zur Kultivierung der Zellen wurden Kulturflaschen aus Polystyrol mit Filter-Schraubverschluss verwendet. Je nach benötigter Zellzahl wurden Kulturflaschen entsprechender Arbeitsvolumina eingesetzt. Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Begasung von 5 % gehalten. Die Zellkonzentration der Suspensionszellen wurde während der Kultivierung auf ca. 1×10^6 Zellen je ml eingestellt. Mit dem Erreichen dieses Wertes wurden die Zellen geerntet oder auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen je ml verdünnt. Adhärenente Zelllinien wurden gesplittet, bevor sich ein zusammenhängender Zellrasen gebildet hatte.

2.2.1.3 Zellernte der Suspensionszellen

Für den Einsatz in Experimenten und zur Erhaltung der Kultur mussten die Zellen geerntet werden.

Dazu wurde ein definierter Teil der Zellsuspension in ein steriles Greiner-Röhrchen überführt. Die verbleibende Zellsuspension wurde in der Kulturflasche mit der entsprechenden Menge frischen Kulturmediums ergänzt.

Die geernteten Zellen wurden mit 340 x g, bei 4 °C für 10 min zentrifugiert, anschließend mit sterilem PBS gewaschen und erneut pelletiert. Der Waschvorgang wurde zur Minimierung von Mediumresten wiederholt.

2.2.1.4 Zellernte der adhärenenten Zelllinien

Um die Dichte der adhärenenten Zelllinien für die weitere Kultur zu verringern, wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, der Zellrasen in der Kulturflasche mit PBS gewaschen und anschließend Trypsin (0,25 % in PBS-EDTA) zugegeben. Die Zellen wurden ca. 5 Minuten mit der Trypsinlösung im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich etwa 80 % der Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt.

Diese Suspension wurde in Greiner-Röhrchen überführt und mit 340 x g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und zu einem definierten Anteil in eine neue Kulturflasche eingesät.

Die Zellernte für nachfolgende Experimente erfolgte mit 2 mM PBS-EDTA-Lösung anstelle von Trypsin, um Veränderungen an Oberflächenstrukturen zu vermeiden. Das Zellpellet wurde abschließend mit PBS gewaschen.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer am Mikroskop.

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in definiertem Verhältnis mit Trypanblau verdünnt.

Nekrotische Zellen nehmen den Farbstoff aufgrund der geschädigten Zellmembran auf und färben sich dunkelblau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen.

Auf die Zählkammer wurde ein Deckgläschen aufgelegt und festgedrückt. Die gefärbte Zellsuspension wurde zwischen Zählkammer und Deckglas pipettiert. In vier Großquadraten der Kammer wurden die lebenden Zellen ausgezählt und anschließend wurde die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Anzahl der Zellen / ml} = N \times 10^4 / V$$

N ist der Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat und V die Verdünnung.

2.2.1.6 Kryokonservierung

Zur Stammhaltung wurden die Zelllinien bei ca. - 170 °C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die geernteten Zellen wurden in 4 °C kaltem Kulturmedium auf eine Zellzahl von $2 - 3 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt. Jeweils 900 µl dieser Zellsuspension wurden in ein Kryogefäß überführt, anschließend wurden 100 µl DMSO hinzuzupipettiert.

DMSO in einer Endkonzentration von 10 % verhindert die Kristallbildung und damit die Zerstörung der Zellen beim Einfrieren.

Die Kryogefäße wurden im Nalgene® Cryo Freezing Container mit Isopropanol 24 Stunden bei -80 °C gekühlt, um anschließend im Stickstofftank längerfristig gelagert zu werden. Isopropanol gewährleistet ein langsames und gleichmäßiges Abkühlen.

2.2.1.7 Auftauen

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Vor dem Öffnen wurde die Oberfläche der Kryoröhrchen desinfiziert. Die Zellen wurden in Greiner-Röhrchen überführt, etwas Medium zugegeben und sofort abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in Medium suspendiert und zentrifugiert. Ziel dieser Waschvorgänge ist das schnelle und möglichst vollständige Entfernen des toxischen DMSO.

2.2.1.8 Hybridomkultivierung

Etablierte Hybridomzellen wurden im beschriebenen Hybridomamedium kultiviert.

Bei einer Zellkonzentration von 1×10^6 / ml wurden die antikörperhaltigen Überstände durch Zentrifugation gewonnen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 gesplittet, erneut eingesät und weiterkultiviert.

Die Überstände wurden durch Zugabe von 0,05 % NaN_3 konserviert.

2.2.1.9 Kultur von AML Blasten

Die AML-Blasten wurden in unserem Institut in RPMI Standardmedium gehalten. Das Medium wurde mit folgenden Zusätzen supplementiert: 200 U / ml GM-CSF, 10 ng / ml SCF, 20 ng / ml IL-3.

Die Kulturdichte der Zellen betrug zwischen 1×10^6 und 1×10^7 je ml Medium.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (FACS für *fluorescence activated cell sorter*) ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Partikelsuspensionen.

So können zum Beispiel Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften sowie nach entsprechender Vorbehandlung anhand intrazellulärer Eigenschaften unterschieden werden.

Die Partikel werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom in der Messküvette an einem Laser vorbeigeleitet.

Die nach vorn gerichteten Strahlen, das Vorwärtsstreulicht, geben Auskunft über die Größe des Partikels. Das seitlich abgelenkte Licht, Seitwärtsstreulicht, gibt Auskunft über die Granularität des Partikels.

Mit fluoreszenzfarbstoffkonjugierten Antikörpern können Moleküle auf der Oberfläche von Zellen und nach Permeabilisierung der Zellmembran auch intrazelluläre Moleküle markiert werden.

Durch das monochromatische Licht des Lasers werden die Fluorochrome angeregt und die Emissionen gemessen. Die Intensität der Emission gibt Auskunft über die Zahl der gebundenen Antikörper und lässt damit Rückschlüsse auf die Zahl der untersuchten Moleküle zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm gearbeitet und die Emission am entsprechenden Emissionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes gemessen, welches bei FITC-Konjugaten zum Beispiel bei 519 nm liegt.

Die Färbung kann bei gängigen Antigenen in einem Schritt durch die direkte Kopplung eines fluorochromkonjugierten Antikörpers an das Antigen erfolgen. Zum Zweck der Detektion von Antigenen, für die bisher keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung stehen, ist der indirekte Nachweis die übliche Methode. Dabei wird das Antigen durch einen monoklonalen Antikörper oder durch Antikörper aus einem polyklonalen Serum gebunden. In einem zweiten Schritt wird der Erstantikörper mit einem fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Dieser bindet spezifisch an den Fc-Teil der Spezies und des Immunglobulinsubtyps des Erstantikörpers.

2.2.2.1 Oberflächenfärbung von Zelllinien

Zelllinien, die mittels Durchflusszytometrie untersucht werden sollten, wurden mit PBS-EDTA abgelöst, gezählt und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml eingestellt. 200 µl der Zellsuspension wurden in je eine Kavität einer Spitzbodenplatte pipettiert. Die Platte wurde bei 1200 rpm und 4 °C fünf Minuten abzentrifugiert.

Die zu färbenden Zellen wurden mit 100 µl Hybridomaüberstand, Negativkontrollen hingegen mit der gleichen Menge Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde 60 min auf Eis inkubiert und anschließend pelletiert. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurde jede Kavität zweimal mit je 200 µl PBS befüllt und erneut zentrifugiert.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Zellen mit je 50 µl verdünntem Sekundärantikörper 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Eingesetzte Sekundärantikörper:

Anti-Maus -IgM-PE	verdünnt 1:600 in PBS
Anti- Maus -IgG-PE	verdünnt 1:600 in PBS
Anti- Maus -Ig-FITC	verdünnt 1:200 in PBS

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jede Kavität mit 100 µl PBS gewaschen. Die gefärbten Zellen sowie die Kontrollproben wurden in FACS-Röhrchen überführt, mit 200 µl Cell Wash versetzt und gemessen.

2.2.2.2 Oberflächenfärbung von PBMC und Granulozyten

PBMC oder Granulozyten wurden isoliert und anschließend entsprechend dem Vorgehen bei Zelllinien gefärbt. Im Anschluss daran wurde je Kavität mit 50 µl 10 %igem Mausserum in PBS für 20 Minuten blockiert, nach Zugabe von 100 µl PBS abzentrifugiert und dann mit je 3 µl unverdünnten direkt markierten Antikörpern 15 Minuten gefärbt. Beide Vorgänge erfolgten in der Spitzbodenplatte auf Eis. Zum Abschluss wurde noch einmal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer FACS-Calibur gemessen.

2.2.2.3 Intrazelluläre Färbung

Zum Anfärben intrazellulärer Antigene wurden die Zellen nach der Ernte mit 25 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS (w / v) für 20 Minuten auf Eis fixiert und danach mit 0,03 % Saponin in PBS 10 Minuten auf Eis permeabilisiert.

Die weiteren Färbeschritte erfolgten analog der Oberflächenfärbung.

2.2.2.4 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mittels DCFDA-Färbung

Die hydrophile Substanz 5-(und 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFDA) ist in ihrer reduzierten Form nicht fluoreszierend. Bei Zugabe zu lebenden Zellen dringt reduziertes DCFDA in die Zellen ein und kann durch intrazelluläre Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oxidiert werden. Dabei entwickelt der Farbstoff eine Fluoreszenz. Diese korreliert mit dem Ausmaß des oxidativen Stresses und kann mit der

Durchflusszytometrie gemessen werden. Die Methode eignet sich daher gut, um intrazelluläre ROS nachzuweisen.

Nach zahlreichen Vorversuchen zur Optimierung der DCFDA-Färbung wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet.

Der trockene Farbstoff wurde unter N₂ Begasung in 94 µl DMSO zu einer 50 µM Stammlösung rekonstituiert und aliquotiert. Die Aliquots der Stammlösung wurden bei -20 °C gelagert.

Die 5 µM Gebrauchslösung wurde für jede Färbung durch 1:10 Verdünnung in PBS frisch hergestellt.

In die Kavitäten einer Spitzbodenplatte wurden je Probe 2×10^5 Zellen gegeben und gewaschen. Die Pellets wurden in 100 µl PBS resuspendiert und mit 5 µl frisch hergestellter DCFDA-Gebrauchslösung versetzt. Anschließend folgte eine Inkubation für 15 Minuten im Brutschrank. Danach wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung überschüssigen Farbstoffes wurde jede Kavität zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und zentrifugiert.

Dann wurden die Zellen in FACS-Messröhrchen überführt und die Fluoreszenz bei 519 nm gemessen.

2.2.2.5 SubG1-Analyse

Die Methode wurde entsprechend den Angaben der Veröffentlichung von Nicoletti et al. von 1991 durchgeführt. Dazu wurden die geernteten Zellen in einem Greiner-Röhrchen 8 Minuten bei 4 °C und 2000 rpm pelletiert, mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70 %igem Ethanol mit Hilfe des Vortexers resuspendiert und mindestens 10 Minuten auf Eis fixiert. Bei umfangreicheren Versuchsreihen mit Ernten zu mehreren Zeitpunkten wurden die Zellen in diesem Zustand bei -40 °C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt gemeinsam mit weiteren Proben gefärbt und gemessen.

Nach Beendigung der Fixierung oder Lagerung wurde 1 ml PBS zugefügt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl PBS-BSA aufgenommen und gevortext. Es folgten die Zugabe von 500 µl DNA-Extraktionspuffer, erneutes Mischen und eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

DNA-Extraktionspuffer setzt sich aus 192 ml 0,2 M Na₂HPO₄ und 8 ml Citronensäure zusammen.

Im Anschluss daran wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl PI-Färbelösung aufgenommen. PI-Färbelösung besteht aus 1 µg Propidiumiodid und 10 µg RNase gelöst in 50 µl PBS.

Diese Mischung wurde nach 30 Minuten in FACS-Röhrchen überführt, mit 200 µl Cell Wash ergänzt und gemessen. Verwendet wurden die Durchflusszytometer FACS-Scan sowie FACS-Calibur. Bei beiden Geräten ist die PI-Färbung im Fluoreszenzkanal 3 zu detektieren.

Da Propidiumiodid (PI) mit der DNA interkaliert, ergibt sich bei der Messung ein charakteristisches Histogramm. Dabei stellt der erste der beiden Hauptpeaks die Zellen in der G0/G1-Phase dar, welche einen einfachen Chromosomensatz aufweisen. Der zweite Peak repräsentiert die Zellen in der G2-Pase, welche einen doppelten Chromosomensatz besitzen. Apoptotische Zellen hingegen, deren DNA bereits durch Nukleasen fragmentiert ist, weisen eine niedrigere Mittlere Fluoreszenzintensität auf und sind daher vor den beiden Hauptpeaks zu finden. Der in diesem Bereich (SubG1) ermittelte prozentuale Anteil der Zellen wird im Folgenden als Apoptoserate bezeichnet.

2.2.3 Aufarbeitung von Gangliosiden aus Zellen

Um das Vorhandensein bestimmter Ganglioside in Zellmaterial zu untersuchen, wurde durch einen Lösungsmittelgradienten ein Lipidextrakt hergestellt. Dieser wurde an einer Reversed Phase (RP) Chromatographie-Säule entsalzt, anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und durch Färbungen analysiert.

2.2.3.1 Herstellung des Rohextraktes

Die Zellen wurden unter Verwendung von PBS-EDTA abgelöst wie unter 2.2.1.4 beschrieben.

Das Zellpellet wurde in 5 ml eisgekühltem Methanol aufgenommen, gevortext und mindestens 15 Minuten auf Eis fixiert, dann der Extraktion zugeführt oder für eine spätere Weiterbearbeitung bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Extraktion wurden die methanolfixierten Zellen 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um einen möglichst vollständigen Aufschluss der Zellen zu erreichen und die Ganglioside im Methanol zu lösen. Um die Zerstörung der Ganglioside zu verhindern, wurden die Reaktionsgefäße vor Licht geschützt und mit Eiswasser gekühlt.

Da an den weiteren Schritten Chloroform als Extraktionsmittel beteiligt war, wurde das Gemisch in Pyrexröhrchen aus Glas mit teflonbeschichteter Abdichtung im Deckel überführt.

Alle verwendeten Gerätschaften und Gefäße aus Glas wurden zuvor im Ultraschallbad mit Aqua dest. und in zwei weiteren Schritten mit Methanol gereinigt.

Es erfolgte eine Zentrifugation des Gemisches für 5 Minuten bei 4000 rpm. Mit einer Glaspipette wurde der Überstand in einen Spitzkolben für den Vakuumrotationsverdampfer überführt. Dieser Rohextrakt wurde vorerst lichtgeschützt auf Eis gelagert.

Das Pellet wurde anschließend mit 5 ml Chloroform/Methanol 1+2 (v / v) resuspendiert und erneut 5 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Der Überstand wurde ebenfalls in den Spitzkolben gegeben.

Der dritte Extraktionsschritt erfolgte wie oben beschrieben mit 5 ml Chloroform/Methanol 2+1 (v / v).

Der gesammelte Rohextrakt im Spitzkolben wurde am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Zur Vermeidung von Schaumbildung und Verlusten wurde dem Rohextrakt 5 ml Entschäumer aus 90 % 1-Propanol und 10 % 1-Butanol zugesetzt. Die Temperatur während der Trocknung wurde durch das Wasserbad des Vakuumrotationsverdampfers auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten, die Einwirkung von direktem Licht wurde vermieden.

2.2.3.2 Entsalzung des Extraktes an einer Reversed Phase Chromatographie-Säule

1g RP18-Material wurde in eine Schott-Produran-Glassäule mit einer Fritte der Größe 4 gegeben. Das Säulenmaterial wurde vor der Aufnahme der Probe durch Spülen mit folgenden Reagenzien vorbereitet:

- 10 ml Chloroform
- 2 x 10 ml Methanol (entgast mit Helium)
- 10 ml Aqua dest. (entgast mit Helium)
- 10 ml 0,1 M KCl-Lösung (hergestellt aus entgastem Aqua dest.)

Die trockene Probe wurde in 5 ml KCl-Lösung aufgenommen und 5 Minuten mit Ultraschall emulgiert, um möglichst kleine Mizellen zu erzeugen. Die Emulsion wurde aus dem Spitzkolben auf die vorbereitete Säule aufgetragen und der Vorgang zur vollständigen Ausnutzung der Probe wiederholt. Der Durchlauf wurde gesammelt und erneut auf die Säule gegeben. Das RP18 – Material mit der gebundenen Probe wurde nun mit 10 ml 0,1 M wässriger KCl-Lösung gespült. Die eigentliche Entsalzung erfolgte durch 30 ml entgastes destilliertes Wasser. Im Anschluss wurde die Probe mit 15 ml entgastem Methanol in einen neuen Spitzkolben eluiert.

Die entsalzte Probe wurde am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet, anschließend mit 2 x 2,5 ml Chloroform/Methanol 2+1 (v / v) in Spitzgläschen überführt und unter einem Stickstoffstrom erneut getrocknet. Je nach eingesetzter Zellzahl des Ausgangsmaterials wurde nun durch Zugabe der entsprechenden Menge Chloroform/Methanol 2+1 (v / v) die Konzentration eingestellt.

Die Überführung in Spitzgläschen mit einem kleinen Volumen ist notwendig, um die Probe mit einer Hamilton-Pipette aufnehmen und auf Platten für die Dünnschichtchromatographie auftragen zu können.

2.2.4 Dünnschichtchromatographie - HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatographie)

Bei der Dünnschichtchromatographie von Glycolipiden erfolgt eine Trennung des Substanzgemisches nach der Polarität der enthaltenen Fraktionen. Als stationäre Phase dient in diesem Fall Kieselgel auf einer Glasplatte, die mobile Phase ist ein Gemisch aus organischen Lösungsmitteln, Alkohol und Wasser.

Für die Auftrennung des Glycolipidgemisches im Rahmen dieser Arbeit wurden Kieselgel 60 HPTLC- Platten von Merck verwendet. Mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze mit entsprechender Dosiervorrichtung wurde 10 mm über der unteren Plattenkante jeweils ein Aliquot der Probe in einer 4 bis 5 mm breiten Bande aufgetragen. Je nach untersuchter Substanz wurde auf einer Bahn ein entsprechender gereinigter Standard aufgetragen.

Der mit Whatman-Chromatographiepapier ausgekleidete DESAGA-Laufmitteltank wurde mit 100 ml Laufmittel aus Chloroform / Methanol / Aqua dest. 120 / 70 / 17 (v / v / v) mit 0,02 % CaCl_2 befüllt und zur Entwicklung einer gesättigten Laufmitteldampfatosphäre mindestens 60 Minuten äquilibriert.

Die Kieselgelplatten wurden für 35 Minuten ins Laufmittel gestellt, dabei erreichten die unpolarsten Substanzen eine Laufhöhe von ca. 80 mm.

Anschließend wurden die Platten mindestens 20 Minuten unter dem Abzug getrocknet.

2.2.4.1 Detektion mit Orcinfärbung

GSL können auf den Chromatographieplatten mit dem Farbstoff Orcin sichtbar gemacht werden. Orcin reagiert mit der Kohlenhydratkomponente der GSL. Ganglioside und neutrale Glycolipide werden als rot-violette Banden detektiert.

Die HPTLC-Platten wurden durch Eintauchen in das Färbereagenz in einer Färbekammer mit dem Farbstoff benetzt. Die Färbung wurde anschließend 20 Minuten bei 95°C entwickelt.

Orcin-Färbelösung für Tauchbad von HPTLC-Platten:

70 mg Orcinpulver (Orcinol-Monohydrat)

100 ml 2N H_2SO_4

Die Orcin-Färbelösung ist ca. 1 Monat bei 4°C haltbar.

2.2.4.2 Detektion mit Primulin - Färbung

Mit Primulin (3-(Galactosyloxy)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-benzopyryliumchlorid) werden kationische, anionische und lipidartige Substanzen unspezifisch angefärbt. Die Methode besitzt eine dreifach höhere Sensitivität im Vergleich zu Orcin.

Nach dem Aufsprühen des Färbereagens können im UV-Licht der Wellenlänge 359 nm grün bis blau fluoreszierende Banden detektiert werden.

Primulin Sprühreagenz:

Stammlösung: 1 g Primulin in 50 ml Aqua dest. gelöst

Gebrauchslösung: 1 ml Stammlösung mit 100 ml Lösungsmittelgemisch
Aceton / Aqua dest. 4:1 (v / v) gemischt

2.2.4.3 Detektion mit Overlay - Immunfärbung

Das Prinzip der Immunfärbung auf HPTLC-Platten mit anschließender semiquantitativer densitometrischer Auswertung wurde 1986 von Bethke et al. beschrieben (Bethke et al., 1986).

Für die Detektion mittels Immunfärbung mussten die Platten zunächst vor dem Ablösen des Kieselgels durch die Einwirkung wässriger Lösungen geschützt werden.

Zu diesem Zweck wurden die Platten zunächst im Exsikkator an der Vakuumpumpe getrocknet und anschließend mit Polyisobutylmethacrylat (Plexigum P28) beschichtet. Die Platten wurden dazu für 40 Minuten in einen Chromatografie-Entwicklungsbehälter mit 40ml Plexigum- Gebrauchslösung gestellt. In dieser Zeit konnte die Lösung im Kieselgel der Platten aufsteigen und zu einer vollständigen Beschichtung führen, welche durchlässig für Reagenzien und Antikörper ist. Nach dieser Behandlung wurden die Platten mindestens 30 Minuten im Abzug getrocknet.

Plexigum – Stammlösung:

35 g Polyisobutylmethacrylat P28

70 ml CHCl₃

350 ml n-Hexan

Plexigum - Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:10 in n-Hexan

Zur Vermeidung unspezifischer Färbungen auf den Kieselgelplatten wurden diese zunächst 20 Minuten bei 30 °C mit 1 %iger BSA-Lösung in PBS abgesättigt.

Nach Entfernung der BSA-Lösung wurde die Platte für 120 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden unverdünnten Hybridomüberstand inkubiert. Die Überstände wurden mehrfach verwendet.

Einsatz der glycolipidspezifischen Hybridomüberstände:

R24 für die Detektion von GD3

M-T6004 für die Detektion von 9-O-acGD3

10C6 für die Detektion von GD3-7-al

Die Platten wurden anschließend viermal mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen, wobei der Waschpuffer bei jedem Schritt 5 bis 10 Minuten einwirken konnte.

PBS-Tween-Waschpuffer:

PBS 9,55 g / l (47,75 g in 5 l Aqua dest.)

+ 0,05 % Tween 21 (2,5 g auf 5 l)

+0,05 % NaN_3 (2,5 g auf 5 l)

Es folgte die 60-minütige Inkubation mit einem mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Goat-Anti-Mouse - Sekundärantikörper bei Raumtemperatur.

Das kommerzielle Produkt wurde 1:1000 in PBS/BSA verdünnt eingesetzt und nach der Nutzung verworfen.

Nach dieser Inkubation erfolgten drei erneute Waschschrte mit PBS-Tween-Waschpuffer und ein Waschschrte mit Glycinpuffer.

Glycinpuffer pH 9,7:

100 mM Glycin (37,54 g / 5 l)

1 mM MgCl (1,02 g / 5 l)

1 mM ZnCl_2 (0,68 g / 5 l)

Der pH-Wert wurde durch die langsame Zugabe von NaOH auf 9,7 eingestellt. Dies stellt die Funktionsfähigkeit der Alkalischen Phosphatase sicher.

Als chromogenes Reagenz wurde im letzten Schritt BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) zugegeben, welches von der Alkalischen Phosphatase zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl und Phosphat hydrolysiert und durch anschließende Oxidation zu blauem 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo dimerisiert.

BCIP - Stammlösung:

20 ml DMF

1 g BCIP

BCIP - Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:100 in Glycinpuffer

Für die semiquantitative densitometrische Abschätzung der Gangliosidmengen wurde der Shimadzu-Scanner CS9001-PC eingesetzt. Es wurde bei einer Wellenlänge von 580nm im Photomodus: „reflection“ und im Scan-Modus „zig zag“ gemessen. Die Mengen wurden durch Integration der Absorptionspeaks und Vergleich mit den Werten definierter Standards ermittelt.

2.2.5 Isolation von Glycolipiden aus lyophilisierter Buttermilch

Für die vorliegende Arbeit wurden größere Mengen GD3 und seiner Metabolite benötigt. Als effektive und kostengünstige Quelle bot sich daher die Isolation der Ganglioside aus Buttermilchpulver an. Durch Lyophilisation von Buttermilch hergestelltes Pulver zeichnet sich neben dem Gehalt an GM3 und GD3 auch durch einen relativ hohen Gehalt an 9-O-acGD3 aus.

Die Schritte des Verfahrens, ihre Produkte und Nebenprodukte sind in Abb. 2.1 veranschaulicht.

Zunächst wurden die GSL aus dem Rohstoff mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert. Die Extrakte wurden durch Dialyse entsalzt, auf einer Kieselgelsäule und einer DEAE-Ionenaustauschchromatographiesäule vorgereinigt und anschließend mittels präparativer HPLC isoliert. Das Prinzip des Verfahrens wurde von Kniep et al. beschrieben (Kniep et al., 1995).

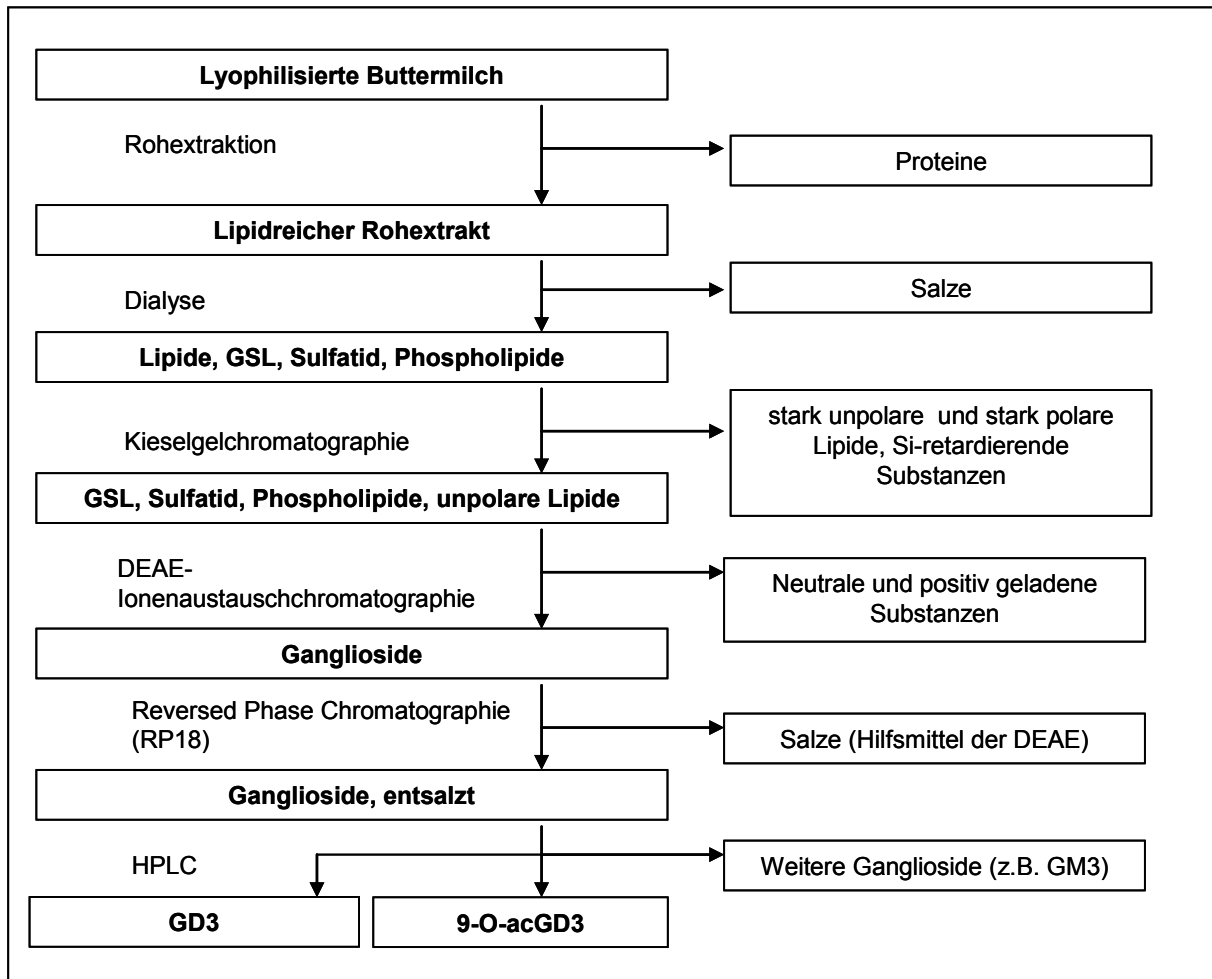


Abbildung 2.1: Fließschema der Herstellung von Gangliosiden aus lyophilisierter Buttermilch

2.2.5.1 Herstellung des Rohextraktes

Alle Arbeiten mit Chloroform und anderen organischen Lösungsmitteln wurden unter einem Abzug ausgeführt.

In ein 5 l-Becherglas wurden 2 l Chloroform sowie 1 l Methanol vorgelegt und 650 g Buttermilchpulver langsam eingerührt. Die Mischung wurde mit einem Magnetrührer ca. 1 Stunde lang zu einer gleichmäßigen Suspension verarbeitet.

Durch Filtern mit einem Büchnertrichter wurde der erste Rohextrakt gewonnen und in einem Rundkolben aufgefangen. Der Filterkuchen wurde für einen zweiten Extraktionsschritt genutzt.

Mit einem Vakuumrotationsverdampfer wurde der erste Rohextrakt getrocknet und das dabei zurückgewonnene Chloroform-Methanolgemisch für die zweite Extraktion gesammelt. Um die Ganglioside nicht zu zerstören, wurde während der Trocknung eine Temperatur von 25 °C durch ein temperiertes Wasserbad sichergestellt. Der trockene Rohextrakt wurde in den Kolben zunächst bei -40 °C gelagert.

Der Filterkuchen wurde mit dem zurückgewonnenen Extraktionsmittel erneut ca. 1 Stunde homogenisiert und anschließend mit dem Büchnertrichter getrennt. Der zweite Rohextrakt wurde analog zum ersten getrocknet und gelagert. Filterkuchen und Extraktionsmittel wurden danach entsorgt.

2.2.5.2 Entsalzung mittels Dialyse

Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche (Spectrapor MWCO 6000 – 8000) verwendet. Die Schläuche wurden vor der Verwendung 30 Minuten in Aqua dest. vorgequollen.

Die trockenen Rohextrakte wurden in je 200 ml Aqua dest. aufgenommen und 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um eine möglichst gute Verteilung der GSL im Wasser zu erreichen.

Die Emulsion wurde auf mehrere Dialyseschläuche aufgeteilt und 3 Tage lang bei 4 °C gegen Aqua dest. dialysiert. Das Dialysewasser wurde alle 12 Stunden gewechselt.

2.2.5.3 Si60-Kieselgel-Chromatographie

Um unpolare Substanzen und Sulfatid abzutrennen sowie zu verhindern, dass Verunreinigungen aus dem Extrakt, die irreversibel an Kieselgel binden, die Säule der HPLC schädigen, wurde der Extrakt zunächst auf Kieselgel in einer Glassäule vorgereinigt.

Eine Glassäule (50 x 300 mm; Fritte 3) wurde zu einem Drittel mit Kieselgel (Silica 60; Korngröße 0,04 – 0,06 mm; Merck) befüllt.

Das Säulenmaterial wurde mit folgenden Lösungsmitteln gewaschen:

- Chloroform (3-faches Volumen des Kieselgelbettes)
- Chloroform / Methanol 1+4 (3-faches Volumen des Kieselgelbettes)
- Chloroform (1-faches Volumen des Kieselgelbettes)
- Äquilibration der Säule mit Chloroform / Methanol im Verhältnis 95/5 (v/v) (3-faches Volumen des Kieselgelbettes)

Die Rohextrakte wurden mit dem Vakuumrotationsverdampfer vollständig getrocknet. Um eine annähernd absolute Trockenheit zu erreichen, wurden am Ende jeweils 100 ml Toluol zugegeben.

Die Extrakte wurden nacheinander in insgesamt 1 l Chloroform / Methanol 95/5 (v/v) gelöst, vereinigt und auf die Säule aufgetragen.

Das Säulenmaterial wurde nun mit weiteren 2 l Chloroform / Methanol 95/5 (v/v) gewaschen. Der Durchlauf wurde aufbewahrt. Anschließend wurde in zwei Schritten zunächst mit 1 l Chloroform / Methanol 85/15 und danach mit 1 l Chloroform / Methanol 1+4 eluiert. Die Fraktionen wurden getrennt aufgefangen und am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Der Durchlauf und die beiden Fraktionen wurden in je 10 ml Chloroform/Methanol 2+1 aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie und Orcinfärbung auf ihren Gehalt an Gangliosiden untersucht.

2.2.5.4 DEAE-Ionenaustauschchromatographie

Zur Abtrennung des Sphingomyelins und der neutralen GSL wurde die Probe der Ionenaustauschchromatographie unterzogen. Die verwendete DEAE (Diethylaminoethyl) - Sepharose ist positiv geladen. Da Ganglioside negativ geladene saure GSL sind, können sie an das Säulenmaterial binden, Sphingomyelin und neutrale GSL werden abgetrennt.

Die Säule wurde durch langsames Waschen mit 2,5 l Methanol über 14 Stunden vorbereitet. Die Fraktionen der Kieselgelchromatografie wurden nach Beurteilung der HPTLC-Platten vereinigt in 1 l Methanol aufgenommen, im Ultraschallbad gelöst und anschließend auf die Säule aufgetragen.

Die Elution erfolgte mit methanolischen Ammoniumacetatlösungen verschiedener Konzentrationen:

- 2 l 0,01 M Ammoniumacetat in Methanol (ca. 2 h)
- 2 l 0,02 M Ammoniumacetat in Methanol (ca. 2 h)
- 1 l 0,08 M Ammoniumacetat in Methanol (ca. 1 h)
- 0,5 l 0,3 M Ammoniumacetat in Methanol (ca. ½ h)

Die Fraktionen wurden nacheinander am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Es folgte die Entsalzung an einer RP18-Säule.

2.2.5.5. Entsalzung mit RP-Säule

Zur Entfernung des Ammoniumacetats erfolgte eine Entsalzung der einzelnen Fraktionen analog der unter 2.2.3.2 beschriebenen Vorgehensweise. Die Menge des Säulenmaterials und aller verwendeten Reagenzien wurde jedoch um den Faktor 10 erhöht.

Die Gangliosid-Gehalte der entsalzten Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und Orcinfärbung überprüft. Die Quantifizierung erfolgte mittels Shimadzu-Scanner anhand definierter Standards. Die entscheidenden Fraktionen wurden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet.

2.2.5.6 HPLC (High Performance Liquid Chromatographie)

Mit einer HPLC- Anlage unter Verwendung einer präparativen Kieselgelsäule (LUNA 10 u Silica(2) 100 A 250 x 21,2 mm 10 mikron; Volumen ca. 80 ml) wurden die Ganglioside isoliert. Zum Schutz vor Korrosion wird die Anlage mit Hexan befüllt gelagert und muss vor der Verwendung auf den Betrieb mit chloroformhaltigen Solventen umgestellt werden. Dazu wurde die Anlage zunächst mit Chloroform / Methanol / Wasser 83 / 16 / 1 (v / v / v), dem Ausgangsgemisch für die nachfolgende Gangliosidpräparation gespült.

Die GSL-haltigen Fraktionen wurden in 30 ml Chloroform / Methanol / Wasser 83 / 16 / 1 (v / v / v) gelöst, in einen 50 ml-Messzylinder überführt und mit der Pumpe der Anlage bei einer Flussrate von 0,5 ml / min auf die Säule aufgetragen. Zur vollständigen Aufnahme der Probe wurde der Messzylinder erneut mit dem Solventengemisch gespült und ebenfalls auf die Säule gepumpt.

Im Verlauf von 264 Minuten wurden die Ganglioside durch einen Gradienten von Chloroform/Methanol/Wasser 83 / 16 / 1 (v / v / v) auf Chloroform / Methanol / Wasser 40 / 50 / 10 (v / v / v) in 132 Fraktionen getrennt und mit einem Fraktionskollektor gesammelt. Dabei wurde eine Flussrate von 2,5 ml / min eingehalten und der Maximaldruck von 250 bar nicht überschritten.

Von jeder Fraktion wurde ein Spot von 2 µl auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und mit Orcin gefärbt, um die gangliosidhaltigen Fraktionen zu identifizieren. Diese wurden dann mit der Dünnschichtchromatographie unter Verwendung der sensitiven Primulinfärbung (beschrieben unter 2.2.4.2) auf Reinheit untersucht. Die Fraktionen mit gleichem Profil wurden vereinigt und anhand des Vergleichs mit definierten Standards mit dem Shimadzu-Scanner quantifiziert.

2.2.6 Herstellung von GD3-7-Aldehyd aus GD3

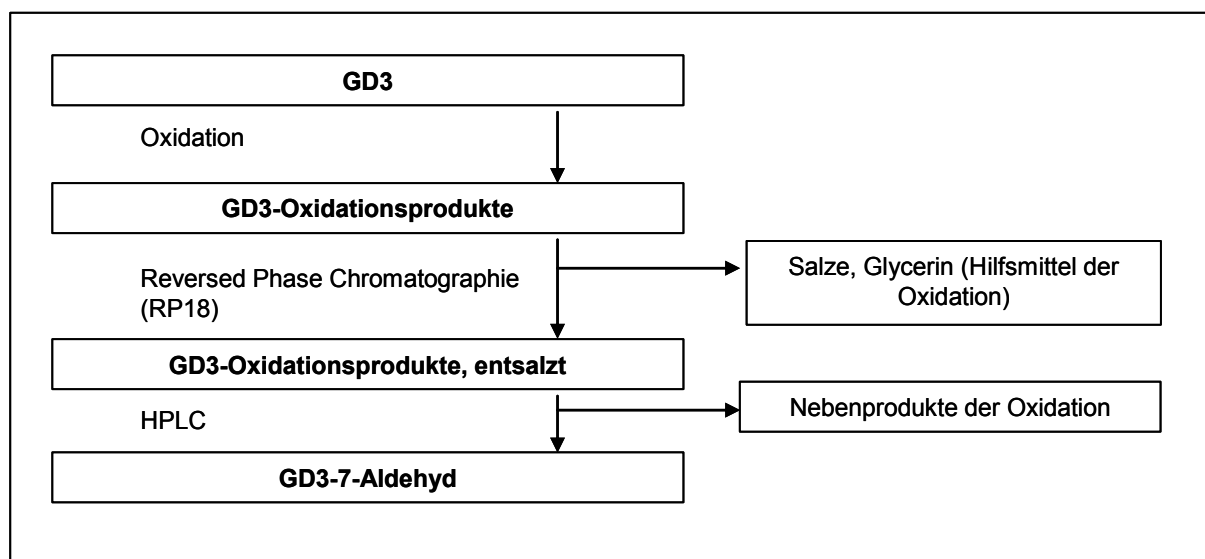


Abbildung 2.2: Fließschema der Herstellung von GD3-7-al aus GD3

Die Verfahrensschritte der Herstellung von GD3 sind in Abb. 2.2 schematisch dargestellt.

Es wurden 10 mg GD3 in 4 ml 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH 5,5) aufgenommen und 10 Minuten im Ultraschallbad gelöst. Zu dieser Lösung wurden 4 ml 10 mM NaIO₄-Lsg. in Na-Acetat-Puffer gegeben und das Gemisch 2 Stunden bei 0 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 2 ml 50 %iger wässriger Glycerinlösung gestoppt. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurde GD3-7-al an einer RP18-Säule entsalzt und das Glycerin entfernt, anschließend in einem Spitzkolben am Vakuumrotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml Chloroform / Methanol 2+1 aufgenommen.

Um eine besonders hohe Reinheit zu erhalten, wurde dieses Produkt abschließend mit HPLC, analog der Gewinnung von Gangliosiden aus Buttermilch, aufgetrennt.

Bei allen Arbeitsschritten wurde die Einwirkung von direktem Licht vermieden.

2.2.6.1 Oxidation von Gangliosiden *in situ* auf HPTLC-Platten

Verwendet wurden Glas-HPTLC-Platten, auf denen Ganglioside als Spot aufgetragen oder durch Chromatographie als getrennte Banden vorlagen. Die Platten wurden 1 Stunde in Dunkelheit auf Eis in 10 mM NaIO₄-Lsg. in Na-Acetat-Puffer inkubiert. Während der Inkubation blieben die Platten vollständig mit der NaIO₄-Lsg. bedeckt und wurden auf einem Wippschüttler stetig leicht bewegt. Im Anschluss wurden die Platten zweimal mit Na-Acetat-Puffer gewaschen. Die Oxidation wurde durch Zugabe von 50 %iger wässriger Glycerinlösung gestoppt. Die Lösung wurde 30 Minuten auf den Platten belassen. Auch

während dieses Schrittes wurden die Inkubationskammern auf Eis gelagert und auf dem Wippschüttler bewegt. Abschließend wurde die Lösung mit kaltem destilliertem Wasser vollständig entfernt.

Die Platten waren danach bereit für die Overlay – Immunfärbung.

In gleicher Weise wurde mit dem für die Charakterisierung des Mausserums 3 verwendeten Gangliosid-Line-Assay-Streifen verfahren.

2.2.6.2 Darstellung von GD3-7-Aldehyd unter Verwendung von Wasserstoffperoxid und Eisen-II-chlorid (Fenton Reaktion)

Aus dem GD3-Standard wurde für jeden Ansatz eine Menge entsprechend 50 µg GD3 in ein Pyrex-Spitzgläschen überführt und unter dem Stickstoffstrom am ReactiVap 3 getrocknet. Die H_2O_2 - und FeCl_2 -Lösungen wurden in Konzentrationen von 200 µM bis 100 mM hergestellt und auf Eis gekühlt.

2,5 ml der H_2O_2 -Lösung wurden dem trockenen GD3 zugefügt und 5 Minuten mit Ultraschall im Eisbad behandelt. Anschließend wurde 2,5 ml FeCl_2 -Lösung hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Damit wurden äquimolare Endkonzentrationen von 100 µM bis 50 mM erzielt.

Nach 2 Stunden Inkubation auf Eis und unter Lichtabschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2,5 ml 50 %iger wässriger Glycerinlösung gestoppt.

Die Entsalzung an der RP18-Säule und die Überprüfung des Ergebnisses mittels Dünnschichtchromatographie und Overlay-Färbung erfolgten wie in diesen Kapiteln beschrieben.

Für die Dünnschichtchromatographie und anschließende Färbung wurde ein Zehntel des entstandenen Produktes eingesetzt.

2.2.7 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen GD3-7-Aldehyd

Die Hybridomatechnik wurde 1975 von César Milstein und Georges Köhler entwickelt, die dafür 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Bei dieser Technik werden antikörperproduzierende Mausmilzzellen mit Maus-Myelomzellen unter Verwendung von Polyethylenglycol fusioniert. Dadurch können die Eigenschaften beider Zelltypen kombiniert werden. Die B-Lymphozyten besitzen das genetische Material für die Produktion der Antikörper, haben allerdings nur eine begrenzte Lebensdauer. Die verwendeten Myelomzellen hingegen unterliegen als stark deregulierte Tumorzellen nicht der Apoptose.

Sie besitzen allerdings einen Defekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT).

Um die bei der Fusion entstehenden gewünschten Hybridomzellen von nicht fusionierten Zellen zu trennen, wird die Selektionsmethode mittels HAT-Medium eingesetzt. Das Medium enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin.

Durch Aminopterin wird der Hauptsyntheseweg der Purine blockiert. Über einen Ausweichweg können Zellen mit intakter HGPRT jedoch aus Hypoxanthin Purine herstellen. Da auch die Synthese von Thymidin blockiert wird, muss diese Base dem Medium zugesetzt werden.

Die Myelomzellen können durch ihren HGPRT-Defekt nicht im Medium überleben, nicht fusionierte B-Lymphozyten gehen nach einiger Zeit in die Apoptose. Nur Zellen mit dem kombinierten Genom aus B-Lymphozyten und Myelomzellen können sich im HAT-Medium etablieren. Aus B-Lymphozyten und Myelomzellen entstehen auf diese Weise antikörperproduzierende immortale Hybridomzellen.

Auf die Selektion im HAT-Medium folgen die Klonierung und die Selektion antikörperproduzierender Klone mit der gewünschten Spezifität.

2.2.7.1 Immunisierung der Mäuse

Es wurden drei Mäuse ((C3H x Balb/c)F1) mit jeweils 50 µg gereinigtem GD3-7-al in Sigma Adjuvant System durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Im Abstand von drei Wochen wurden Nachimmunisierungen mit der gleichen Menge Antigen vorgenommen. Nach der dritten Boost-Injektion wurde der Serumtiter bestimmt. Eine der Mäuse zeigte einen besonders hohen Titer und wurde für die Fusion herangezogen.

Alle Arbeitsschritte der Fusion erfolgten unter sterilen Bedingungen. Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf 37 °C temperiert.

2.2.7.2 Vorbereitung der Myelomzellen

Die Maus-Myelomzelllinie X63Ag8.653 wurde 14 Tage vor der Fusion aufgetaut, in RPMI 1640 mit 10 % FKS kultiviert und auf Mycoplasmenfreiheit getestet. Da sich die Zellen zum Fusionszeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase befinden müssen, wurde die Zellsuspension mehrere Tage vor der Fusion täglich gesplittet und mit frischem Medium versorgt. Am Tag der Fusion wurden die Zellen geerntet und zweimal mit serumfreiem Grundmedium gewaschen, jeweils 5 Minuten bei 340 x g abzentrifugiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau gezählt.

Die Zellzahl der Myelomzellen wurde auf 1×10^7 eingestellt.

2.2.7.3 Präparation der Milzzellen

Nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation wurde die Milz entnommen und in serumfreiem Medium zum Ort der Fusion transportiert. Sie wurde mit einer Pinzette vorsichtig von anhaftendem Bindegewebe befreit. Zur schonenden Gewinnung der Zellen wurde die Milz in ein Haarsieb auf einer Petrischale überführt. Unter Verwendung einer 20 ml Spritze mit einer G20 Kanüle wurde das Gewebe mehrmals mit Präparationsmedium ausgespritzt und anschließend mit Hilfe des Spritzenstempels durch das Sieb passiert.

Die Zellsuspension wurde in serumfreiem Grundmedium aufgenommen und 5 Minuten bei 340 x g pelletiert.

Durch Zählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Die Verwendung von Essigsäure zum definierten Verdünnen der Zellsuspension führt zur Lyse störender Erythrozyten.

2.2.7.4 Fusion der Milz- und Myelomzellen

Die Zellen der Milzpräparation und die Myelomzellen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend 3 Minuten bei 340 x g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet durch leichtes Aufklopfen gelockert.

Mit einer 2 ml Messpipette wurden innerhalb einer Minuten unter langsamem Drehen des Zentrifugenröhrchens 0,5 ml Polyethylenglycol-Lösung zu den Zellen gegeben. Die Suspension wurde 1 Minute lang vorsichtig weiter mit der Pipettenspitze durchmischt.

Innerhalb der nächsten Minute wurde 1 ml und innerhalb der nächsten 3 Minuten wurden 7 ml serumfreies Medium tropfenweise zugegeben.

Die Suspension wurde im Anschluss 3 Minuten lang bei 340 x g pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 20 ml HAT-Medium mit IL-6 resuspendiert und in 96 - well Flachboden-Mikrotiterplatten ausplattiert. In jede Kavität wurden 200 µl Suspension pipettiert, was einer Zellzahl von 2×10^5 entsprach.

Die Immunisierung der Mäuse (2.2.7.1), die Präparation der Milzzellen (2.2.7.3) sowie die Fusion (2.2.7.4) wurden durch Frau Christine Gräfe am Institut für Immunologie ausgeführt.

2.2.7.5 Selektion und Klonierung

Mit dem Mikroskop wurden die Platten im Abstand von 48 Stunden kontrolliert, um das Wachstum von Hybridomzellen zu überwachen und die Ausbreitung möglicher Schimmelpilzinfektionen vermeiden zu können. Im Abstand von etwa 4 Tagen wurde der Überstand aus Kavitäten mit proliferierenden Zellen vorsichtig entnommen und für das Screening verwendet. Die Zellen wurden in den ersten Wochen mit frischem HAT-Medium, später für einige Passagen mit HT-Medium und im Folgenden mit Hybridoma-Anzuchtmedium versorgt.

Für die Klonierung wurden die Zellen aus Kavitäten mit antikörperhaltigem Überstand entnommen, gezählt und für die Aussaat in neuen Mikrotiterplatten soweit verdünnt, dass auf jede Kavität rechnerisch weniger als eine Zelle entfällt.

Die auf diese Weise neu eingesäten Zellen wurden unter regelmäßiger Kontrolle im Brutschrank inkubiert. Aus dicht bewachsenen Kavitäten wurde erneut der Überstand entnommen und dem Screening zugeführt.

Zellen aus Vertiefungen mit positiv reagierenden Überständen wurden erneut in der beschriebenen Weise kloniert. Um die Monoklonalität der produzierenden Zellen sicherzustellen, wurden die Zellen mit der interessantesten Reaktivität mehrfach subkloniert.

2.2.7.5.1 Screening

Für das Screening der Überstände wurde eigens eine Methode entwickelt, wie in 3.2.2 dargelegt. Daraus resultierte das im Folgenden beschriebene Protokoll.

Kieselgelbeschichtete HPTLC-Platten aus Aluminium wurden in 20 mm x 4 mm große Streifen geschnitten. Mit einer Hamilton-Mikroliterspritze wurde je 1 µg des benötigten Antigens (GD3-7-al, GD3 oder kommerziell erhältliche Präparationen aus Hirngangliosiden) als Spot auf den Streifen aufgetragen. Die Streifen wurden im Exsikkator an der Vakuumpumpe getrocknet und in einem 2-minütigen Tauchprozess mit Polyisobutylmethacrylatlösung beschichtet. Diese Teststreifen wurden gemäß des Protokolls der Immunfärbung durch Overlay-Technik zum Test der Hybridomaüberstände eingesetzt. Es wurden Inkubationswannen mit 12 Bahnen verwendet, die sicherstellten, dass die Teststreifen mit 1 ml Überstand bzw. Reagenzien vollständig bedeckt wurden und außerdem eine Abarbeitung des Screenings mittels Mehrkanalpipette ermöglichten.

Die Hybridomaüberstände wurden in den Screening-Versuchen 1:5 und der goat-anti-mouse-Ig-AP Sekundärantikörper 1:1000 verdünnt in PBS/BSA verwendet.

2.2.7.5.2 Ermittlung der Spezifität

Nach der ersten Klonierung wurden die Überstände auf Glas-HPTLC-Platten mit verschiedenen weiteren Gangliosiden getestet, um die Spezifität neben der Reaktion mit GD3-7-al zu prüfen. Es wurde jeweils eine Platte mit in situ oxidierten Antigenen und eine Platte ohne oxidative Behandlung eingesetzt. Die Platten wurden ebenfalls durch die Overlay-Technik mit den Überständen in der Verdünnung 1:2 mit PBS/BSA gefärbt.

2.2.7.5.3 Bestimmung der Immunglobulinklasse und des Subtyps

Von den Klonen mit der interessantesten Spezifität wurde die Immunglobulinklasse bestimmt. Dazu wurde der oben beschriebene Screeningtest mit IgM- und IgG-spezifischen Zweitantikörpern wiederholt sowie „IsoStrip“, ein Isotyping Kit von Roche® zur Ermittlung des Subtyps nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.8 Separation mononukleärer Zellen (PBMCs) und Granulozyten aus Vollblut

Die PBMCs und Granulozyten wurden unter Verwendung von Histopaque®-1077 und Histopaque®-1119 über eine Zwei-Schicht-Dichtegradienten-Zentrifugationsmethode aus 24 ml EDTA-Vollblut gewonnen.

In ein 50 ml-Greiner-Röhrchen wurden 12 ml Histopaque®-1119 gegeben und mit 12 ml Histopaque®-1077 überschichtet. Auf den oberen Gradienten wurden vorsichtig 24 ml Vollblut aufgetragen und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur und 700 x g zentrifugiert. Dabei wurden die unterschiedlichen Zellarten in Fraktionen getrennt. Das Pellet enthielt die Erythrozyten. Darüber befand sich Histopaque®-1119 mit der aufgelagerten Schicht der Granulozyten und darüber wiederum Histopaque®-1077 mit der aufgelagerten Schicht der PBMCs.

Die Zellfraktionen wurden getrennt mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in Greiner-Röhrchen überführt, die verbleibenden Flüssigkeiten verworfen. Die Zellen wurden jeweils zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und bei 200 x g abzentrifugiert. Sie wurden gezählt und für die Untersuchung der Oberfläche mittels Durchflusszytometrie gefärbt oder für die Lipidextraktion und anschließende Overlay-Färbung des Extraktes auf HPTLC-Platten verwendet.

2.2.8.1 Isolation einzelner Leukozytenpopulationen mittels MACS Technologie

Aus peripheren mononukleären Blutzellen wurden einzelne Leukozytenpopulationen immunmagnetisch isoliert. Die PBMCs wurden mit entsprechenden antikörpermarkierten MicroBeads inkubiert und anschließend mit dem Separator AutoMACS® isoliert.

2.2.8.1.1 Positivselektion von Monozyten

Für die Isolation wurden 3×10^7 PBMC in 240 µl PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA (MACS-Puffer) aufgenommen und mit 60 µl der antikörpergekoppelten magnetischen Beads von Miltenyi Biotec für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Für die Isolation von Monozyten wurden mit CD14-Antikörpern gekoppelte Beads verwendet.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 100 µl MACS-Puffer gewaschen, 10 Minuten bei 4 °C und 340 g abzentrifugiert und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Mit dem MACS Separator wurden die Zellen an einer magnetischen Säule isoliert.

Die Zellen wurden mit der Zentrifuge sedimentiert und in Standardmedium aufgenommen.

2.2.8.1.2 Positivselektion von Slan-DCs mit M-DC8

Bei der Isolation von Slan-DCs wurden die PBMCs zunächst 15 Minuten bei 4°C mit 1:60 in PBS verdünntem M-DC8-Hybridomüberstand inkubiert. Für 1×10^7 PBMC wurden 100 µl Antikörperlösung eingesetzt. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 1 µl anti-mouse IgM Microbeads (Miltenyi Biotec) je 1×10^7 Zellen resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden die Zellen erneut gewaschen und in MACS-Puffer aufgenommen. Es folgte die Separation am AutoMACS®.

2.2.9 Generierung und Maturierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten

Die Ableitung dendritischer Zellen von Monozyten erfolgte *in vitro* durch die Kultur isolierter Monozyten mit Zytokinen.

Die Monozyten wurden zunächst durch die MACS-Technologie unter Verwendung CD14 gekoppelter magnetischer Beads isoliert. Eine Zellzahl von 5×10^6 Monozyten wurde in 4 ml RPMI Standardmedium in Kultur genommen. Dem Medium wurden 1000 U / ml GM-CSF und 1000 U / ml IL-4 zugesetzt. Nach 48 Stunden wurden die ersten phänotypischen Veränderungen mit dem Mikroskop beobachtet. Es folgte die Zugabe von 1 ml frischem Medium mit den genannten Zytokinzusätzen und die Inkubation für weitere 24 Stunden.

Die inzwischen adhärennten Zellen wurden mit PBS-EDTA abgelöst, mit Standardmedium gewaschen und gezählt. Ein Drittel dieser immaturen Mo-DCs wurden für sofortige Färbungen eingesetzt, zwei Drittel wurden mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen in frisches Standardmedium eingesät. Diesem Medium wurden zur Maturierung der Mo-DCs folgende Zytokine zugesetzt:

- 1000 U / ml IL-4
- 1000 U / ml GM-CSF
- 1000 U / ml IL1 β
- 1000 U / ml IL-6
- 1000 U / ml TNF α
- 1000 U / ml PGE-2

Nach 48 Stunden wurden diese nun maturierten Mo-DCs mit PBS-EDTA geerntet, gewaschen und für Färbungen eingesetzt.

2.2.10 Indirekte Immunfluoreszenz

2.2.10.1 Aufzentrifugieren von Suspensionszellen auf Objektträger

Um Suspensionszellen oder apoptotische und daher nicht mehr adhärente Zellen auf Glasobjektträger zu bringen, damit sie mit der indirekten Immunfluoreszenz untersucht werden konnten, kam die Cytospinzentrifuge zum Einsatz. Es wurden 50 µl der Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml in den auf den Objektträger geklemmten Zentrifugentrichter pipettiert und anschließend für 3 Minuten bei 330 rpm zentrifugiert.

2.2.10.2 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen auf Objektträgern

Es wurde eine 4 %ige Formaldehydlösung in PBS hergestellt. Dazu wurde 1 g PFA trocken in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 25 ml PBS über einer Flamme geschwenkt bis eine klare Lösung entstand. Diese Lösung wurde vor der Verwendung auf Eis gekühlt. Auf die mit Zellen belegte Fläche wurde ein Tropfen von ca. 30 µl Formaldehydlösung pipettiert und der so vorbereitete Objektträger für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Tropfen abgesaugt und durch 30 µl Saponinlösung ersetzt. Es folgte eine erneute Inkubation für 20 Minuten auf Eis. Die Saponinlösung wurde abgesaugt und die Zellen sofort gefärbt.

2.2.10.3 Fluoreszenzfärbung von Zellen und Geweben auf Objektträgern

Die Färbung der auf Objektträgern fixierten Zellen erfolgte ähnlich der Färbung für die Durchflusszytometrie in zwei Inkubationsschritten.

Der Zellsplot wurde mit Hybridomüberstand benetzt. Dazu wurde ein großer Tropfen von ca. 30 µl auf jeden Zellsplot gesetzt. In einer als „Feuchte Kammer“ bezeichneten mit nassem Filterpapier ausgelegten Box wurden die Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Objektträger in einer Küvette mit PBS-Tween gewaschen. Nach einer sorgfältigen Trocknung der Rückseite sowie der Ränder mit Filterpapier, wurde 1:10 in PBS verdünntes Anti-Mouse-FITC-Konjugat aufgetragen. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation in der Feuchten Kammer bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss.

Die Objektträger wurden erneut dreimal für je 2 Minuten gewaschen sowie auf der Rückseite und an den Rändern getrocknet. Die Zellspots wurden mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium benetzt und der Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Kommerzielle Objektträger mit fixierten Gewebeschnitten wurden auf die gleiche Weise gefärbt.

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop AKLIDES beurteilt und Aufnahmen mit der integrierten Kamera gemacht.

2.2.11 Immunhistochemische Färbung mit modifizierter ABC-Methode

Das Gewebe wurde uns vom Institut für Pathologie durch Herrn PD Dr. med. Michael Muders aus Schnellschnitten im Rahmen von Tumorresektionen zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden sofort nach der Entnahme im nativen Zustand in Röhrchen für die Kryokonservierung verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Transport erfolgte im Isolierbehälter auf Trockeneis und die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80 °C.

Zur Vorbereitung der Anfertigung von Schnittpräparaten wurden die Proben im gefrorenen Zustand in vorgekühlte Kunststoffkassetten platziert und auf Trockeneis in *Leica Tissue Freezing Medium* eingebettet. Die Proben wurden so bis zum Schneidevorgang auf Trockeneis gelagert. Die Anfertigung der Schnittpräparate erfolgte durch Frau Christina Hiller am *Mikrotom Leica CM1900*. Die Präparate wurden mit 5µm Schnittdicke angefertigt und auf Objektträger mit adhäsiver Beschichtung (Starfrost, Engelbrecht) aufgetragen und getrocknet.

Die Fixierung erfolgte bei Raumtemperatur mit 4 % Formaldehyd-Lösung für 30 Minuten in einer Glasküvette. Die Formaldehydlösung wurde zuvor durch Lösen von Paraformaldehyd in PBS über der Brennerflamme im Abzug hergestellt.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Präparate dreimal jeweils 5 Minuten lang in PBS gewaschen.

Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurde auf jedes Präparat 0,5 ml Dako Dual Endogenous Enzyme Block aufgetragen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in PBS für 5 min.

Danach wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit verdünntem Normalserum aus der Spezies des Sekundärantikörpers (5 % v/v Ziegenserum in 2 % BSA w/v in PBS) für eine Stunde inkubiert.

Die Primärantikörper wurden als Hybridomüberstand unverdünnt mit einem Volumen von 250 µl eingesetzt. Die Präparate wurden mit Parafilm abgedeckt und in der Feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Absaugen der Primärantikörper wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten lang in kaltem PBS gewaschen.

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper (Goat-anti-Mouse IgG 1:1000 in 2 % BSA w/v in PBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein Streptavidin-HRP- Komplex (Dako) 1:200 verdünnt in PBS-BSA eingesetzt. Die Präparate wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dieser Lösung benetzt.

Ohne weitere Waschschrte wurde die Färbung mit Vector DAB Substrate Kit entwickelt. Die DAB-Arbeitslösung wurden gemäß den Angaben des Herstellers direkt vor der Verwendung aus 5 ml Aqua dest. mit 84 µl Buffer Stock Solution und 100 µl DAB Stock Solution sowie 80 µl Wasserstoffperoxid Stock Solution und 80 µl Nickel Solution hergestellt. Die Gewebe wurden 8 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 200 µl Arbeitslösung überschichtet. Die Intensität der Färbung wurde am Mikroskop überwacht.

Die Präparate wurden dann 5 Minuten in der Küvette mit Leitungswasser gewaschen und abschließend für 30 Sekunden in Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung gegengefärbt. Nach kurzem Wässern unter fließendem Leitungswasser wurde mit Eindeckmedium auf Wasserbasis (Aquatex®, Merck) eingedeckt.

Es erfolgte eine Fotodokumentation am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop im Durchlicht unter Verwendung des 10-fach- und des 40-fach-Objektivs.

Die als Positivkontrolle verwendeten SK-Mel-23-Zellen wurden mit der CytoSpin-Zentrifuge auf Starfrost-Adhäsiv-Objektträger zentrifugiert, mit einem Tropfen TissueTec bedeckt, auf Trockeneis eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Fixierung und Färbung erfolgten in gleicher Weise, wie die der Gewebeschnitte.

2.2.12 Behandlung von HL60 mit GD3-7-Aldehyd

Die für den entsprechenden Ansatz benötigte Menge GD3-7-al wurde in ein mit Chloroform / Methanol 2+1 gereinigtes Pyrexgläschen überführt und unter dem Stickstoffstrom am ReactiVap getrocknet.

Dem trockenen Gangliosid wurde Standard RPMI zugesetzt und durch vortexen sowie 15 - minütige Ultraschallbehandlung unter Kühlung mit Eiswasser suspendiert.

In 2,5 ml dieses Mediums wurden 1×10^6 Zellen eingesät und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet.

2.2.13 Inkubationsversuche von Molt-4 mit unterschiedlichen GD3-Derivaten

Die Inkubation der Molt-4-Zellen mit den verschiedenen GD3-Derivaten erfolgte bei einer Konzentration von 300 μM Gangliosid im Medium. Als Positivkontrolle zur Apoptoseinduktion wurde ein Medium mit C2-Ceramid in einer Konzentration von 40 μM , als Negativkontrolle Standardmedium eingesetzt.

Die benötigte Menge des jeweiligen Gangliosids wurde dem entsprechenden quantifizierten Standard entnommen und entsprechend dem Vorgehen unter 2.2.11 getrocknet und in Medium suspendiert.

Für die Positivkontrolle eingesetztes C2-Ceramid, welches als Trockensubstanz kommerziell verfügbar ist, wurde zunächst mit DMSO zu einer 10 mM Stammlösung rekonstituiert und dann mit Medium auf die Endkonzentration von 40 μM verdünnt. Die DMSO-Konzentration dieses Inkubationsmediums ist vernachlässigbar.

Die Molt-4-Zellen wurden gezählt und in definierter Dichte von 1×10^6 Zellen / ml mit dem entsprechenden Inkubationsmedium in eine Zellkulturplatte eingesät. Zu den Messzeitpunkten wurde ein Teil der Zellen entnommen und für die SubG1-Analyse verwendet.

2.2.14 Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in HEp-2 durch UV-Bestrahlung

In Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für die Durchführung der UV-Bestrahlung zur Induktion von ROS für verschiedene Zelllinien ermittelt.

HEp-2-Zellen für Versuche mit UV-Bestrahlung wurden mit einer Zellzahl von 7×10^5 in Petrischalen mit einem Durchmesser von 20 cm eingesät und 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit hatte sich ein nahezu konfluenter Zellrasen gebildet.

Um die Absorption der UV-Strahlung durch das Medium zu minimieren, wurde vor der Bestrahlung die Hälfte des Mediums abgesaugt und verworfen.

Die Inkubationskammer des UV-Bestrahlungsgerätes BioLink BLX-254 wurde vor Versuchsbeginn durch Bestrahlung mit hoher UV-Dosis sterilisiert.

Nach dem Verbringen der Petrischalen in das Gerät wurden die Deckel entfernt und die Zellen mit 80 oder 100 mJ/cm^2 bei 254 nm bestrahlt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml frischem Standardkulturmedium und eine Nachinkubation von einer Stunde im Brutschrank bei 37 °C.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS-EDTA geerntet, mit PBS gewaschen und Aliquots nach verschiedenen Färbemethoden durchflusszytometrisch untersucht.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit können in drei Teilgebiete untergliedert werden.

Um die Fragestellungen der Arbeit zu beantworten, waren zunächst die Voraussetzungen zu schaffen.

Für die Überprüfung der Bindefähigkeit der gangliosidspezifischen Antikörper und für die Durchführung der Inkubationsversuche wurden über mehrere Chromatographieschritte die Ganglioside GD3 und 9-O-acGD3 aus lyophilisierter Buttermilch gewonnen. Aus GD3 wurde artifiziell das oxidierte Derivat GD3-7-al hergestellt. Dabei wurde erstmals die Reinigung von GD3-7-al mit der HPLC durchgeführt.

Die Reinheit der Produkte wurde überprüft und die Menge bestimmt.

Der zweite Teilschritt umfasst die Entwicklung und Charakterisierung eines neuen gangliosidspezifischen monoklonalen Antikörpers, der gegen GD3-7-al gerichtet ist. Dieser Antikörper wurde mittels Hybridomatechnik hergestellt. Um die antikörperproduzierenden Zellen zu selektieren, wurde eine neue Screeningmethode auf kieselgelbeschichteten Aluminiumplatten entwickelt.

Die Spezifität, Sensitivität sowie die Eignung des neuen monoklonalen Antikörpers für die Verwendung in der Durchflusszytometrie sowie in der indirekten Immunfluoreszenz wurden getestet.

Im dritten Abschnitt der Arbeit wurde das Auftreten von GD3-7-al untersucht. Dabei wurden mehrere unterschiedliche Ansätze verfolgt, um Hinweise auf die Funktion des Moleküls zu erhalten.

Entsprechend der Vermutung, dass GD3-7-al ein proapoptotisches Molekül sei, wurde der Einfluss der unterschiedlichen GD3-Derivate auf die Apoptoserate der GD3-resistenten Zelllinie Molt-4 untersucht.

Um den Mechanismus der Entstehung von GD3-7-al in der Zelle zu beleuchten, wurde GD3 *in vitro* unter in der Zelle möglichen Bedingungen oxidiert und GD3-7-al als Produkt mit dem monoklonalen Antikörper nachgewiesen.

Es folgten Untersuchungen des Vorkommens von GD3-7-al in verschiedenen Primärzellen und -geweben mit Hilfe der Durchflusszytometrie, dem Nachweis von Gangliosiden durch Lipidextraktion mit anschließender Dünnschichtchromatographie sowie durch die indirekte Immunfluoreszenz. Tumorzelllinien wurden auf ihren Gehalt von GD3-7-al untersucht und die Induzierbarkeit des Moleküls auf der Membranoberfläche unter Verwendung verschiedener Stimuli geprüft. Das Vorkommen von GD3-7-al auf Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie wurde untersucht.

3.1 Darstellung der Glycolipidantigene GD3, 9-O-acetyl-GD3 und GD3-7-Aldehyd

3.1.1 Isolation von GD3 und 9-O-acetyl-GD3 aus lyophilisierter Buttermilch

Das Gangliosid GD3 und sein 9-O-acetyliertes Derivat wurden wie unter 2.2.5 beschrieben nach dem von Kniep et al. 1995 veröffentlichten Verfahren aus lyophilisierter Buttermilch extrahiert und über mehrere Chromatographieschritte gereinigt.

3.1.1.1 Reinigung des Rohextraktes über Si60-Kieselgelchromatographie

Die Trennung des Rohextraktes an der Kieselgelchromatographiesäule erfolgte nach der Polarität der Substanzen unter Verwendung von Eluenten verschiedener Chloroform- und Methanolkonzentrationen.

Der Rohextrakt wurde in einem Lösungsmittelgemisch (CM 95 / 5) aus 95 % Chloroform und 5 % Methanol (v / v) gelöst, auf die Säule aufgetragen und mit dieser mobilen Phase gewaschen. Dabei wurden zunächst die stark unpolaren Lipide und ein Teil des Sulfatids, eines schwefelhaltigen Glycolipids, abgetrennt.

Der Hauptteil der Ganglioside wurde mit einer Mischung aus 85 % Chloroform mit 15 % Methanol (v / v) von der Säule eluiert (Fraktion CM 85 / 15). Im Buttermilchextrakt sind dies vor allem die Ganglioside GM3 und GD3 sowie 9-O-acGD3. Diese konnten auf der HPTLC-Platte anhand der Laufhöhe durch den Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert werden. Die Bande, die leicht oberhalb von GD3 migriert, ist als 9-O-acGD3 zu interpretieren.

Die abschließende Elution mit 20 % Chloroform und 80 % Methanol (v / v) eluierte den verbliebenen Teil der Ganglioside und die polaren Substanzen, wie zum Beispiel das Phospholipid Sphingomyelin.

Stark retardierende Substanzen verblieben am Säulenmaterial und wurden damit aus der Probe entfernt, konnten also auch nicht die Trennleistung der späteren HPLC beeinträchtigen.

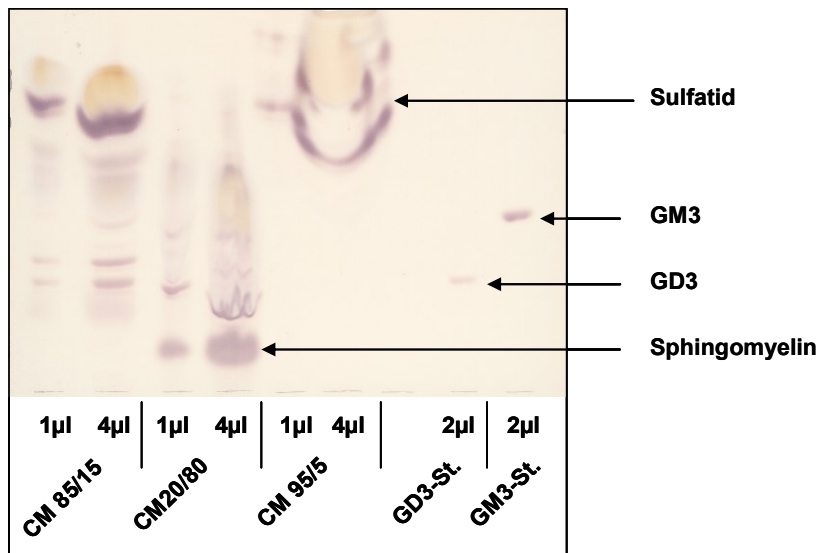


Abbildung 3.1: HPTLC der Fraktionen der Kieselgelchromatographie gefärbt mit Orcin.

CM 85 / 15: Fraktion Chloroform/Methanol 85 / 15 (v / v) mit großen Mengen GD3 und ohne Sphingomyelin; CM 20 / 80: Fraktion Chloroform / Methanol 20 / 80 (v / v) enthält neben wenigen Gangliosiden große Mengen Sphingomyelin; CM 95 / 5: Fraktion Chloroform / Methanol 95 / 5 (v / v) ohne Ganglioside und mit großem Anteil Sulfatid; GD3-St.: GD3 Standard; GM3-St.: GM3 Standard.

Da die Fraktion CM 95 / 5 keine Ganglioside enthielt, konnte von einer ausreichenden Kapazität des Säulenmaterials und damit von einer effektiven Trennung ausgegangen werden. Die Kieselgelchromatographie wurde daraufhin als erfolgreich betrachtet, und der nächste Schritt erfolgte.

Um Ganglioside hoher Reinheit zu erhalten, wurde nur die Fraktion CM 85 / 15 für die weitere Reinigung eingesetzt.

Aus dieser Fraktion war bereits nach diesem Schritt das störende Sphingomyelin weitgehend entfernt. Die Fraktion 20 / 80, welche ebenfalls eine große Menge GD3 enthielt, wurde für eine erneute Reinigung an der Kieselgelsäule aufbewahrt.

3.1.1.2 Reinigung des Glycolipidgemisches über DEAE-Sepharose-Ionenaustauschchromatographie

Um aus dem mittels Kieselgelchromatographie vorbehandelten Rohextrakt die neutralen Glycolipide und positiv geladene Substanzen zu entfernen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Das positiv geladene Säulenmaterial der Diethylaminoethyl-Sepharose-Matrix (DEAE-Sepharose) bindet negativ geladene Bestandteile der Lösung. Neutrale und positiv geladene Teilchen verbleiben im Durchlauf.

Da Ganglioside aufgrund der dissoziierten Carboxygruppe der Sialinsäure eine negative Ladung tragen, werden sie am Säulenmaterial adsorbiert und können mit dem negativ geladenen Ammoniumacetatpuffer wieder von der Säule eluiert werden.

Die größte Menge der Disialoganglioside GD3 und 9-O-acGD3 war erwartungsgemäß in der 0,08 molaren Ammoniumacetat-Fraktion zu finden.

Diese Fraktion wurde für die finale Reinigung des GD3 mittels HPLC eingesetzt.

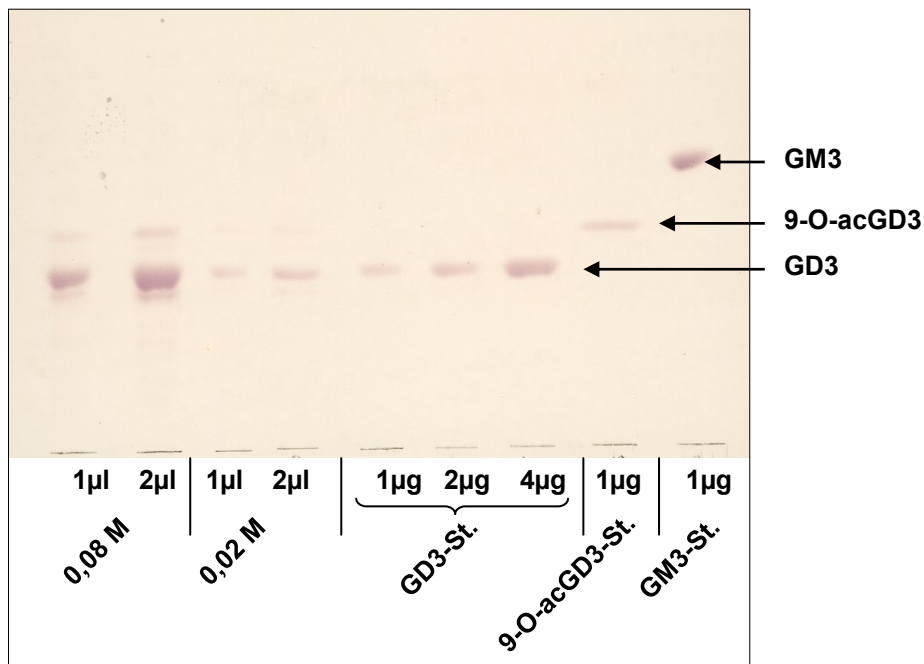


Abbildung 3.2: HPTLC der Fraktionen der DEAE-Ionenaustauschchromatographie gefärbt mit Orcin.

Die Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie sind frei von neutralen und positiv geladenen Substanzen. 0,08 M: 0,08 molare Ammoniumacetat-Fraktion mit dem größten GD3-Gehalt und geringen Mengen 9-O-acGD3; 0,02 M: 0,02 molare Ammoniumacetat-Fraktion mit geringen Mengen GD3; GD3-St.: Standard GD3; 9-O-acGD3-St.: Standard 9-O-acGD3; GM3-St.: Standard GM3.

3.1.1.3 Reinigung der Ganglioside GD3 und 9-O-acetyl-GD3 mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Das Verfahren der HPLC zeichnet sich durch eine gute Trennleistung bei hoher Geschwindigkeit aus. Dabei wird die mobile Phase mit hohem Druck durch die dicht gepackte stationäre Phase in der Säule gepresst.

Für die finale Reinigung der Disialoganglioside wurde eine präparative Kieselgelsäule verwendet. Als mobile Phase wurde ein linearer Lösungsmittelgradient aus Chloroform, Methanol und Wasser mit im Verlaufe des Trennprozesses ansteigender Polarität eingesetzt.

Demzufolge werden in den frühen Fraktionen die unpolaren Substanzen gesammelt, während zu späteren Zeitpunkten der Trennung die polaren Substanzen eluiert werden. Das Eluat wurde in insgesamt 132 Proben von je 2 ml fraktioniert.

Die Detektion der gangliosidhaltigen Fraktionen erfolgte zunächst durch das punktförmige Auftragen eines Aliquots jeder Fraktion auf eine HPTLC-Platte mit anschließender Orcinfärbung. Die gangliosidhaltigen Proben wurden daraufhin dünnsschichtchromatographisch untersucht. Vor der Anfärbung der HPTLC-Platte mit Orcin wurde die Reinheit der Fraktionen mit der sensitiveren Primulinmethode im UV-Licht kontrolliert.

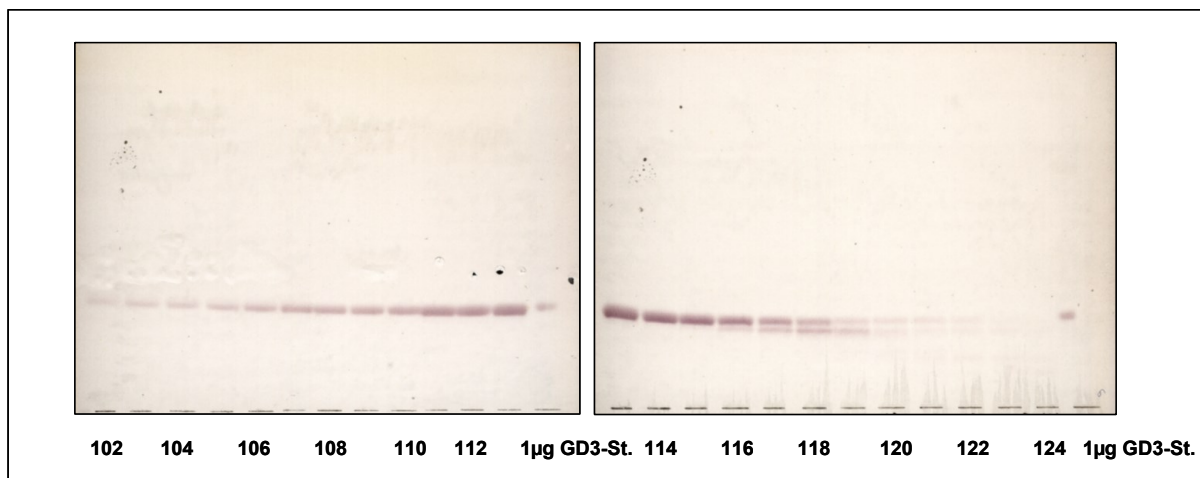


Abbildung 3.3: HPTLC der GD3-haltigen Fraktionen der HPLC gefärbt mit Orcin.

102 – 124: je 5µl der HPLC-Fraktion. Die Fraktionen 108 – 115 repräsentieren reines GD3. GD3-St.: je 1µg GD3-Standard

Die Fraktionen 108 bis 119 enthielten sauberes GD3. In den Fraktionen 108 – 115 ist GD3 mit nur einer Bande vertreten, in den höheren Fraktionen ab 116 ist dagegen eine zusätzliche untere Bande zu detektieren. Dieses für Dünnschichtchromatogramme von Gangliosiden typische Bild nah beieinander liegender Doppelbanden kommt durch das Vorhandensein von Gangliosiden mit unterschiedlich langer Fettsäurekette zu Stande.

Die Fraktionen ab 120 zeigten im UV- Licht nach Primulinfärbung weitere untere Banden, welche entweder GD3 mit noch kürzerer Fettsäure oder aber Gangliosiden mit weiteren Kohlenhydratresten und dadurch erhöhter Polarität zugeordnet werden können.

Die Fraktionen 108 – 115 wurden als qualitativ gleichwertig beurteilt und gepoolt. Sie stellten die Grundlage des in weiteren Experimenten verwendeten GD3 dar. Eine weitere Sammelprobe wurde aus den Fraktionen 116 – 119 hergestellt. Die höheren Fraktionen wurden als mögliche GD3 Resource für weitere Aufarbeitungen eingelagert.

9-O-acGD3 wurde aufgrund seiner etwas geringeren Polarität und damit früheren Elution im Verlauf der HPLC in den Fraktionen 89 – 96 detektiert.

Da bereits abzuschätzen war, dass die 9-O-acGD3 Menge sehr gering ist, wurden diese Fraktionen für eine Weiterbearbeitung mit anderen 9-O-acGD3-haltigen Proben aus vorangegangenen Präparationen aufbewahrt.

Die Fraktionen zwischen 96 und 108 enthielten sowohl GD3 als auch 9-O-acGD3 und wurden ebenfalls für die erneute Reinigung zurückgestellt.

3.1.1.4 Quantifizierung des gewonnenen Gangliosids GD3

Die gereinigten Ganglioside, die entsprechend ihrer Qualität zu Sammelproben zusammengeführt wurden, wurden densitometrisch quantifiziert.

Dabei werden die Banden gescannt und die Absorption mit der eines definierten Standards verglichen.

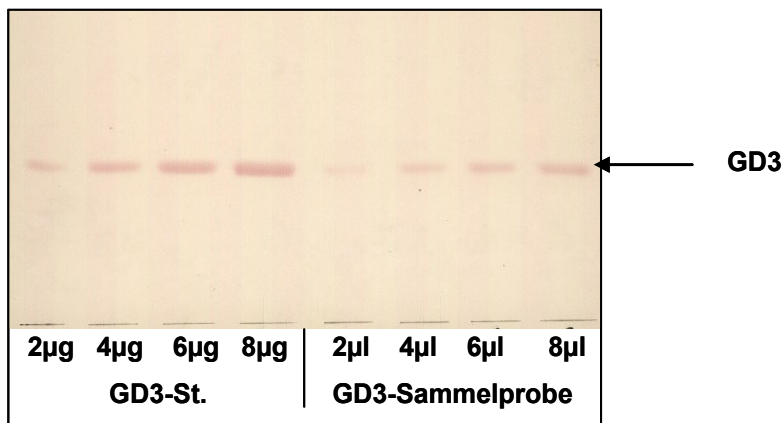


Abbildung 3.4: HPTLC der GD3-haltigen Sammelprobe aus den HPLC-Fraktionen 108 - 115 für die Quantifizierung gefärbt mit Orcin.

GD3-St.: GD3 Standard der Konzentration 1 mg/ml; GD3-Sammelprobe: Sammelprobe des reinen GD3 nach der HPLC-Reinigung in 1:2 Chloroform/Methanol gelöst.

Mit dem Shimadzu-Scanner wurde anhand der Absorption durch Vergleich mit dem definierten Standard für die Sammelprobe 108 - 115 eine Menge von ca. 36 mg GD3 ermittelt.

3.1.1.5 Aufarbeitung von Gangliosidproben zur Gewinnung von 9-O-acetyl-GD3

Da die gewonnene Menge an 9-O-acGD3 erwartungsgemäß gering ausfiel, war eine weitere Aufarbeitung notwendig.

Darum wurde auf 9-O-acGD3-haltige Proben aus vorangegangenen Buttermilchaufarbeitungen zurückgegriffen. Da alle diese Materialien bereits mindestens einmal an einer Kieselgelchromatographiesäule gereinigt wurden, konnte auf diesen Schritt verzichtet werden. Dieses Ausgangsmaterial wurde vereinigt und einer DEAE-Ionenaustauschchromatographie und abschließender HPLC unterzogen.

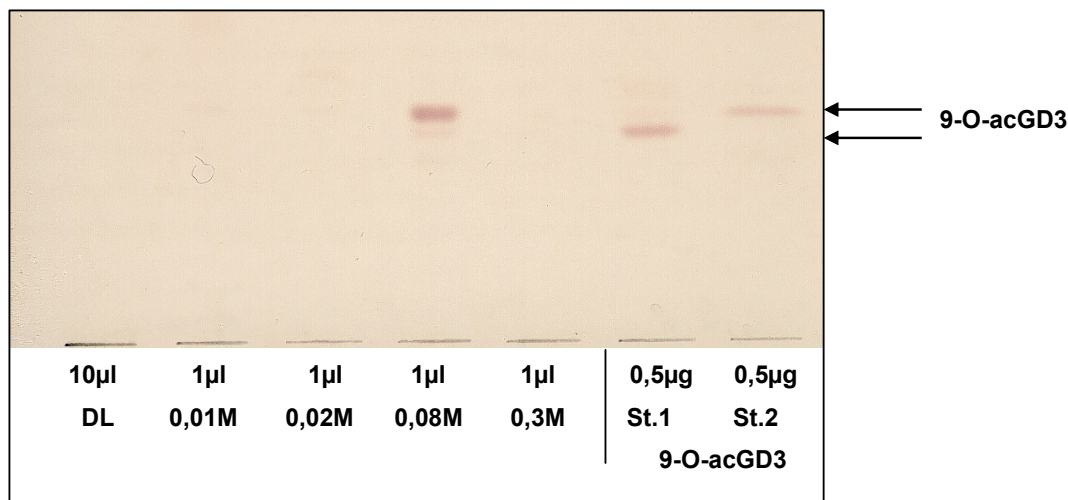


Abbildung 3.5: HPTLC der 9-O-acGD3-haltigen Fraktionen der DEAE - Ionenaustauschchromatographie gefärbt mit Orcin.

DL: 10 µl Säulendurchlauf; 0,01 M: 0,01 molare Ammoniumacetat-Fraktion; 0,02 M: 0,02 molare Ammoniumacetat-Fraktion; 0,08 M: 0,08 molare Ammoniumacetat-Fraktion, 0,3 M: 0,3 molare Ammoniumacetat-Fraktion; St.1: 9-O-acGD3 Standard der unteren Bande; St.2: 9-O-acGD3 Standard der oberen Bande.

Wie erwartet, enthielt die 0,08 molare Ammoniumacetat-Fraktion das 9-O-acGD3 (Abb. 3.5). Dieses wurde abschließend mittels HPLC gereinigt und entsprechend der Qualität zu Sammelproben zusammengefasst. HPLC-Fractionen mit einer einzelnen Bande wurden zu Sammelprobe A, Fractionen mit Doppelbande zu Sammelfraktion B zusammengeführt.

Die Quantifizierung erfolgte anhand eines definierten GD3-Standards (Abb. 3.6).

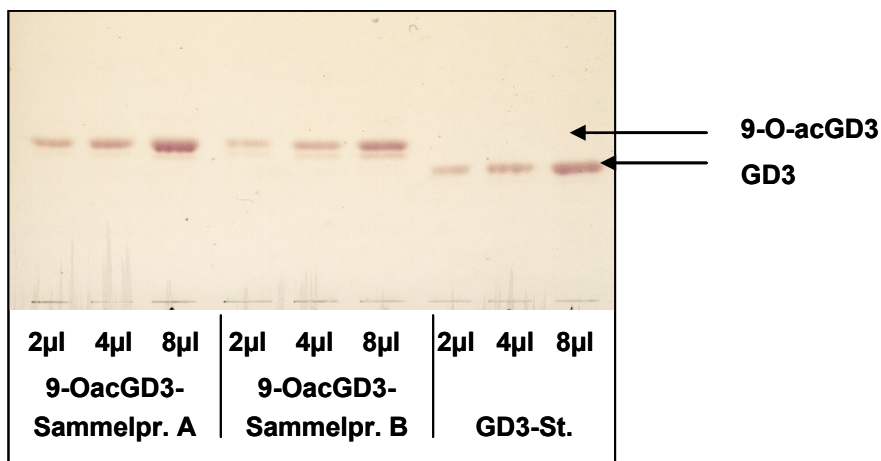


Abbildung 3.6: HPTLC der 9-O-acGD3-haltigen Sammelproben für die Quantifizierung gefärbt mit Orcin.

Sammelpr. A: Sammelprobe der Fraktionen mit oberer Bande; Sammelpr. B: Sammelprobe des 9-O-acGD3 mit Doppelbande; GD3-St.: GD3 Standard der Konzentration 1mg/ml

Für Sammelprobe A wurde ein 9-O-acGD3-Gehalt von 1 mg / ml ermittelt, die Sammelprobe B enthielt 1,15 mg / ml.

Für die weiteren Versuche wurde die Probe A verwendet, welche mit einem Volumen von 10 ml ausreichend Material lieferte.

3.1.2 Darstellung von GD3-7-al aus GD3 unter Verwendung von Natriumperjodat

Die selektive Veränderung der exocyclischen Seitenkette der Sialinsäure durch die milde Perjodat-Oxidation wird bereits 1956 durch Fritz Heckner und Reimer Strufe beschrieben. Aus der Oxidation des Gangliosids GD3 resultiert nach diesem Verfahren das Produkt GD3-7-al. In einer Kooperation unseres Instituts mit dem DKFZ Heidelberg wurde dieses Ergebnis massenspektrometrisch bestätigt.

Für die Herstellung von GD3-7-al dienten 19 mg aus Buttermilch gewonnenes GD3 als Präkursorsubstanz.

Die Oxidation mit Natriumperjodat, das Stoppen der Reaktion sowie das Entsalzen der Probe erfolgten wie unter 2.2.6 beschrieben. Um ein besonders reines Produkt zu erhalten, wurde die oxidierte Probe abschließend mit HPLC gereinigt.

Die densitometrische Quantifizierung auf HPTLC-Platten ergab insgesamt 16 mg GD3-7-al.

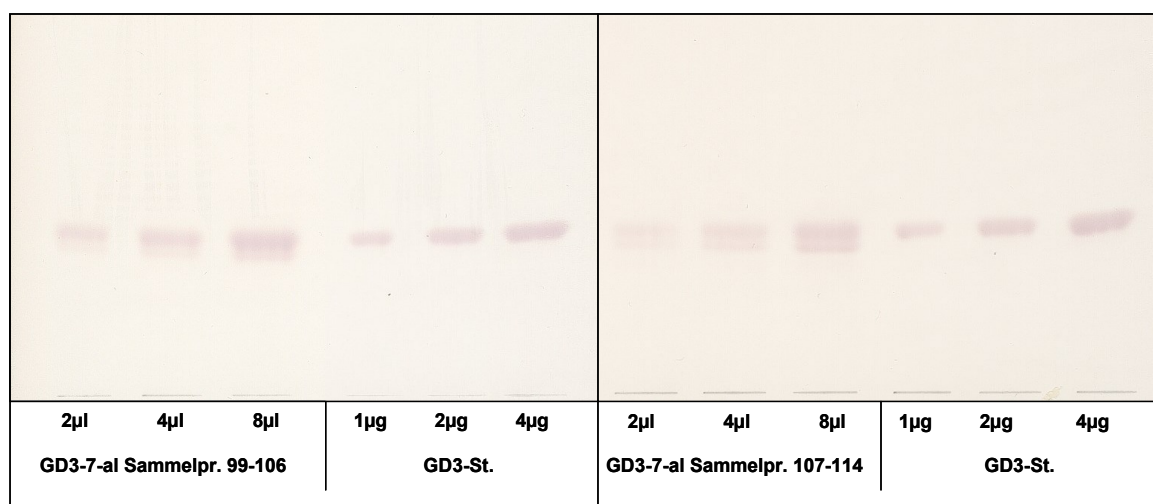


Abbildung 3.7: HPTLC der GD3-7-Aldehyd-Sammelproben für die Quantifizierung gefärbt mit Orcin.

GD3-7-al Sammelpr. 99-106: Sammelprobe der Fraktionen 99 - 106; GD3-7-al Sammelpr. 107-114: Sammelprobe der Fraktionen 107 - 114; GD3-St.: GD3 Standard der Konzentration 1 mg/ml.

In den Fraktionen 84 bis 99 wurde neben GD3-7-al eine weitere unpolare Substanz detektiert. Diese Proben wurden als GD3-7-al-haltig zurückgestellt. Wie bei dem als Ausgangssubstanz eingesetzten GD3 ist auch bei GD3-7-al eine Doppelbande zu detektieren, welche auf die Kettenlängendifferenz der an den Molekülen beteiligten Fettsäuren zurückzuführen ist.

Die Fraktionen 99 bis 106 enthielten ein reines Produkt mit einer Bande in der Laufhöhe von GD3. Die untere Bande ist hier nur sehr schwach, der Anteil an Molekülen mit kürzerer Fettsäure demzufolge gering. Die daraus hergestellte Sammelprobe ergab 7,5 mg GD3-7-al. Die Sammelprobe aus den Fraktionen 107 - 114 enthielt 5,5 mg GD3-7-al mit deutlich ausgeprägter Doppelbande.

Die Betrachtung dieser Proben im UV-Licht nach Primulinfärbung ergab keinen Hinweis auf Verunreinigungen.

Die beiden Sammelproben 99 - 106 und 107 - 114 wurden für alle folgenden Experimente eingesetzt.

3.2 Herstellung eines GD3-7-Aldehyd-spezifischen monoklonalen Antikörpers

Zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers gegen GD3-7-al wurden drei Mäuse mit GD3-7-al in Sigma Adjuvant System immunisiert. Im Abstand von drei Wochen wurden Nachimmunisierungen vorgenommen. Nach der dritten Boost-Injektion wurde das Serum der Tiere auf GD3-7-al-spezifische Antikörper untersucht. Die Immunisierung der Tiere sowie die Blutabnahmen erfolgten durch Frau Christine Gräfe am Institut für Immunologie.

Alle drei Mäuse hatten Antikörper gegen GD3-7-al entwickelt. Kein Serum zeigte Reaktivität gegen das unveränderte Gangliosid GD3. Die Maus 3 mit dem höchsten Serumtiter wurde für die Fusion herangezogen.

An Abbildung 3.8 wird auch deutlich, dass GD3 und GD3-7-al in ihrem chromatographischen Laufverhalten identisch sind und eine zweifelsfreie Unterscheidung nur über die Färbung mit einem spezifischen Antikörper möglich ist.

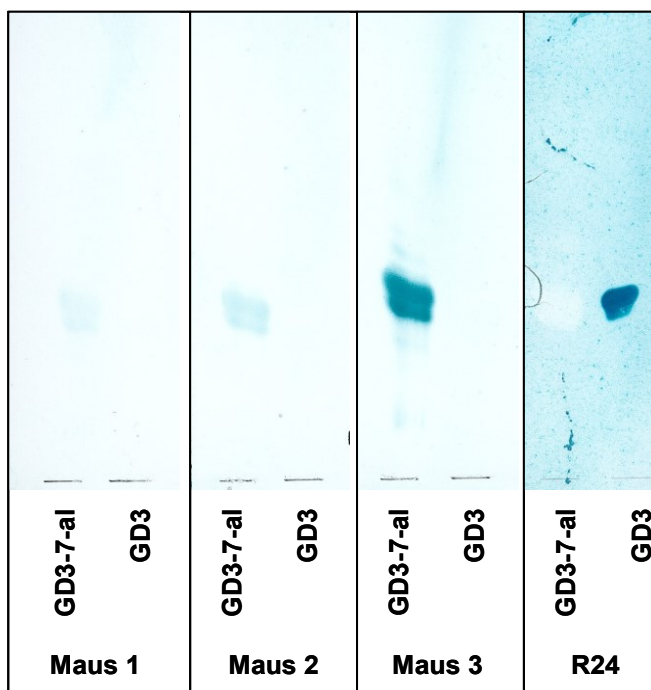


Abbildung 3.8: Test der Reaktivität der Mausseren auf HPTLC mit GD3-7-al und GD3 in Overlaytechnik.

Die HPTLC-Platten sind auf Spur 1 jeweils 10 µg GD3-7-al und auf Spur 2 jeweils 10 µg GD3 beladen. Alle drei Mausseren reagieren mit GD3-7-al, keines mit unverändertem GD3. Die parallel mit R24 inkubierte Platte derselben Charge dient als Kontrolle für den Nachweis des Vorhandenseins von GD3.

Die Spezifität des polyklonalen Serums der Maus 3 wurde mit einem modifizierten Gangliosid-Line-Assay zur Detektion von Gangliosidantikörpern überprüft. Die Ganglioside auf den Teststreifen wurden in situ oxidiert und jeweils ein oxidiertes und ein nicht oxidiertes Streifen mit dem Mausserum inkubiert.

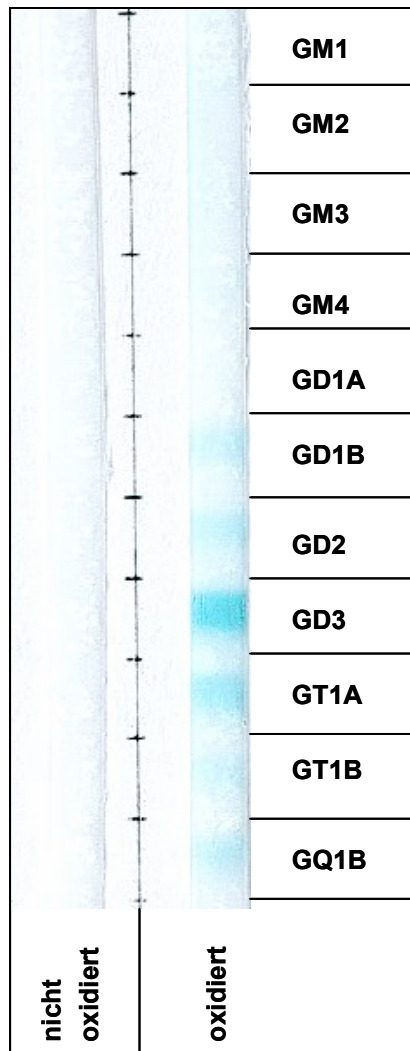


Abbildung 3.9: Test der Reaktivitäten des Serums der Maus 3 auf einem modifizierten kommerziellen Teststreifen zur Detektion von Gangliosidantikörpern.

Das Serum reagiert nur mit Gangliosiden des oxidierten Streifens wobei sich eine Gruppenspezifität abzeichnet. Mit unveränderten Gangliosiden reagiert das Serum nicht.

Das Mausserum zeigte keine Reaktivität auf nicht oxidierte Ganglioside, während sich bezüglich oxidierter Ganglioside bereits eine Gruppenspezifität abzeichnete.

Alle vom Mausserum erkannten Ganglioside haben eine strukturelle Gemeinsamkeit: Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal. Die terminale Sialinsäure (Neu5Ac) ist dabei oxidiert.

3.2.1 Milzpräparation und Fusion

Die Maus 3 wurde getötet und ihre Milz präpariert, um die antikörperproduzierenden Zellen zu gewinnen, die mit den vorbereiteten Myelomzellen fusioniert werden sollten. Milzpräparation, Vorbereitung der Myelomzellen, die Fusion und Kultivierung der Zellen erfolgten wie unter 2.2.7 beschrieben durch Frau Christine Gräfe am Institut für Immunologie.

3.2.2 Entwicklung einer Screening-Methode für Hybridoma-Überstände

Für das Screening der produzierenden Zellen wurde eigens ein neues Verfahren entwickelt. Verschiedene Immobilisierungsverfahren von Glycolipiden an festen Phasen resultieren in unterschiedlicher Akzessibilität der Epitope. Dies führt zu unterschiedlichen Werten für Spezifität und Sensitivität der Verfahren.

Für den Fall des GD3-7-al erwies sich die Immobilisierung in ELISA-Platten als offenbar ungeeignet, da entsprechende Vorversuche keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten.

Ein gängiges Verfahren zur Auftrennung und Detektion von Glycolipiden mit kohlenhydratspezifischen Antikörpern ist die Dünnschichtchromatographie auf kieselgelbeschichteten Glas- oder Aluminiumplatten.

In Anlehnung an dieses Verfahren wurden zum Screening der Hybridomüberstände kieselgelbeschichtete Glasplatten zu miniaturisierten Testplatten geschnitten, die in Inkubationswannen für handelsübliche Streifentests mit 1 ml Reagenz prozessiert werden konnten.

Um einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen, wurde dann auf kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten zurückgegriffen, die einfacher zugeschnitten und mit Antigen beladen werden konnten.

Um ein Ablösen des Kieselgels von den Platten während der Inkubation zu verhindern sowie ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis zu erzielen, wurden verschiedene Beschichtungsvarianten, unterschiedliche Puffer und Inkubationszeiten getestet. Dabei diente das beschriebene polyklonale Mausserum mit Reaktivität gegenüber oxidiertem GD3 als Positivkontrolle.

Das Beschichten der Kieselgelplatten erfolgt in der Standardmethode chromatographisch durch Aufsteigen der Polyisobutylmethacrylatlösung im Kieselgel der Platte. Da diese Technik für die miniaturisierten Testplatten nicht praktikabel war, wurde nach geeigneten Bedingungen für ein Tauchverfahren gesucht. Die für das chromatografische Verfahren übliche Inkubationszeit erwies sich als zu lang, da dann keine Antigendetektion mit dem Serum mehr gezeigt werden konnte. Durch Verkürzung der Zeit auf 2 Minuten, konnte eine verwendbare Beschichtung erzielt werden, welche die immunchemische Färbung ermöglichte und noch hinreichende Stabilität gegenüber dem Ablösen der

Kieselgelbeschichtung im Ablauf der nachfolgenden Inkubationsschritte aufwies. Unterschiedliche Temperaturbedingungen und Zeitdauern bei der Absättigung der freien Bindungsstellen auf dem Kieselgel mit bovinem Serumalbumin (BSA) wurden getestet und führten zum Ergebnis, dass das Einwirken einer 1 % BSA-Lösung für 20 Minuten bei 30°C sich am günstigsten auf das Signal-Hintergrund-Verhältnis auswirkt. Die Inkubationsbedingungen des Primär- und Sekundärantikörpers hatten keinen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis. Sowohl eine Erstinkubation über Nacht bei 4 °C oder für 120 Minuten bei Raumtemperatur lieferten vergleichbare Resultate. Gleiches galt für den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper, der bereits nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und in einer Verdünnung von 1:1000 eine Farbreaktion katalysieren konnte. Die Entwicklung der Farbreaktion mit BCIP in einem alkalischen Puffersystem beeinflusste das Signal-Hintergrund-Verhältnis wiederum stark und ein Einfluss der Pufferbedingungen auf die Stabilität der Kieselgelschicht wurde vermutet. Es wurden TRIS- und Glycinpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 7,5 und 8,0 für TRIS-Puffer, pH 9,7 für Glycinpuffer) in Kombination mit unterschiedlichen BCIP-Konzentrationen (1 % und 0,5 %) getestet und die optimale Zeit bis zum Abstoppen der Reaktion ermittelt. Dabei zeigte sich, dass stark alkalische Bedingungen die Beschichtung nicht beeinflussen, die Dauer bis zum Abstoppen jedoch möglichst kurz gehalten werden muss, um das Ablösen zu verhindern. Die optimalen Bedingungen der BCIP-Inkubation wurden mit 1 %iger Lösung und einer Dauer von 20 Minuten ermittelt.

Das aus diesen Versuchen resultierende Protokoll für das Screening der Hybridomaüberstände wurde im Abschnitt Material und Methoden 2.2.7.5.1 beschrieben.

3.2.3 Vermehrung und Klonierung der produzierenden Zellen

Mit der neuen Screening-Methode wurden die vorsichtig entnommenen Überstände getestet und so die Kavitäten mit produzierenden Zellen identifiziert. Diese Zellen wurden weiterkultiviert und zunächst durch Erweiterung auf mehrere Kavitäten unter Zugabe von frischem Hybridom-Anzuchtmedium vermehrt. Auch diese Kavitäten wurden wiederum nach einigen Tagen durch einen Screening-Schritt mit oxidiertem GD3 selektioniert.

Vor der ersten Klonierung wurde die Reaktion der Überstände der Kavitäten mit antikörperproduzierenden Zellen auf oxidierte Hirnganglioside getestet. Dazu wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten jeweils mit einem Spot von 1 µg Gemisch aus Hirngangliosiden und je einem Spot von 1 µg GD3 versehen und die Ganglioside auf den Platten wie beschrieben *in situ* oxidiert und mit den Überständen inkubiert. Auf diese Weise erfolgte eine Identifizierung der Überstände mit besonders geringer oder besonders starker Reaktion mit den oxidierten Hirngangliosiden und mit starker Reaktion mit oxidiertem GD3. In einem Screeningschritt mit unverändertem GD3 wurde geprüft, dass die Überstände keine unerwünschte Reaktion auf dieses nicht oxidierte Gangliosid zeigten. Die Zellen der entsprechenden Kavitäten wurden dann zur Herstellung monoklonaler Antikörper herangezogen. Dafür wurden sie mit einer Dichte von statistisch weniger als einer Zelle je Vertiefung ausgesät und die Überstände der bewachsenen Kavitäten nach einigen Tagen erneut getestet. Produzierende Zellklone mit starker Reaktivität wurden erneut in gleicher Weise subkloniert.

Die Klonierung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Gräfe, wobei die Arbeitsschritte der Weiterkultivierung überwiegend von ihr vorgenommen wurden, während die Screenings durch mich erfolgten.

3.2.4 Spezifität der Klone

Aus den vorangegangenen Schritten resultierten 12 Zellklone, die in einem größeren Volumen kultiviert werden konnten. Die Spezifität der Überstände von 10 Klonen wurde detaillierter untersucht. Dabei kamen Gangliosidpräparationen aus humanen Hirngangliosiden und Disialopolylactosaminylceramide zum Einsatz.

Die in den verwendeten Präparaten enthaltenen Glycolipide sind in Abb. 3.10 gezeigt. Die Präparate wurden chromatographisch auf HPTLC-Platten aufgetrennt und für diese Abbildung mit Orcin gefärbt. Die Präparation humaner Hirnganglioside (Abb.3.10, Spur 1) enthält vor allem GD3 sowie auch GT1b, GD1a und GD1b.

Die von Dr. Bernhard Kniep bereitgestellte aus Leukozyten gewonnene Glycolipidpräparation enthält ebenfalls GD3. GSL kommen oft mit unterschiedlich langen Fettsäureketten vor und ergeben daher bei der Chromatographie charakteristische Doppelbanden. Die Unterschiede in der Migrationshöhe der Disialopolylactosaminylceramide resultieren jedoch aus den Unterschieden in der Kohlenhydratkette. Diese enthalten bis zu dreimal redundant die Strukturkomponente Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal-4GlcNAc und migrieren auf den HPTLC-Platten je nach Häufigkeit dieser Glycankette (Fukuda et al., 1985).

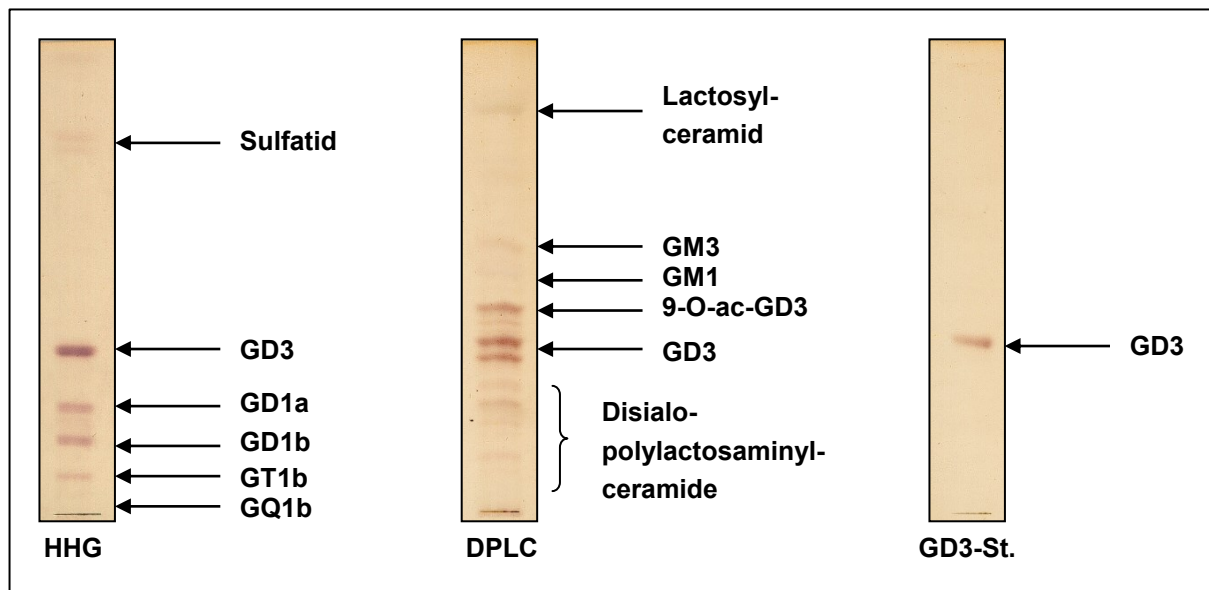


Abbildung 3.10: Chromatographie und Orcinfärbung der Glycolipide humaner Hirnganglioside, der Disialopolylactosaminylceramide aus Leukozyten und des GD3-Standards für die Testung der Reaktivitäten der Hybridomüberstände.

HHG: 3 µl Gemisch humaner Hirnganglioside, DPLC: 3 µl Disialopolylactosaminylceramid-Standard; GD3-St.: 1 µg GD3.

Für den Test der Spezifität wurden die chromatographierten GSL auf den Platten entsprechend der in Kapitel 2.2.6.1 beschriebenen Methode *in situ* oxidiert.

Die mit den 10 verschiedenen Überständen inkubierten Platten sind in Abb. 3.11 gezeigt.

Der Test der Zellüberstände der ausgewählten Hybridome auf Spezifität gegenüber oxidierten Disialopolylactosaminylceramiden zeigte erwartungsgemäß für alle Hybridome eine vergleichbare Reaktion. Die Reaktion auf oxidierte Hirnganglioside fiel bei den verschiedenen Zellüberständen unterschiedlich aus.

So reagieren zum Beispiel die Antikörper des Hybridoms 9D7 sehr deutlich mit oxidierten Gangliosiden in der Laufhöhe von GD1b und GT1b (Abb. 3.11, 3. Platte), während bei Hybridom 10C6 auf dieser Höhe keine Banden zu erkennen sind (Abb. 3.11, 1. Platte).

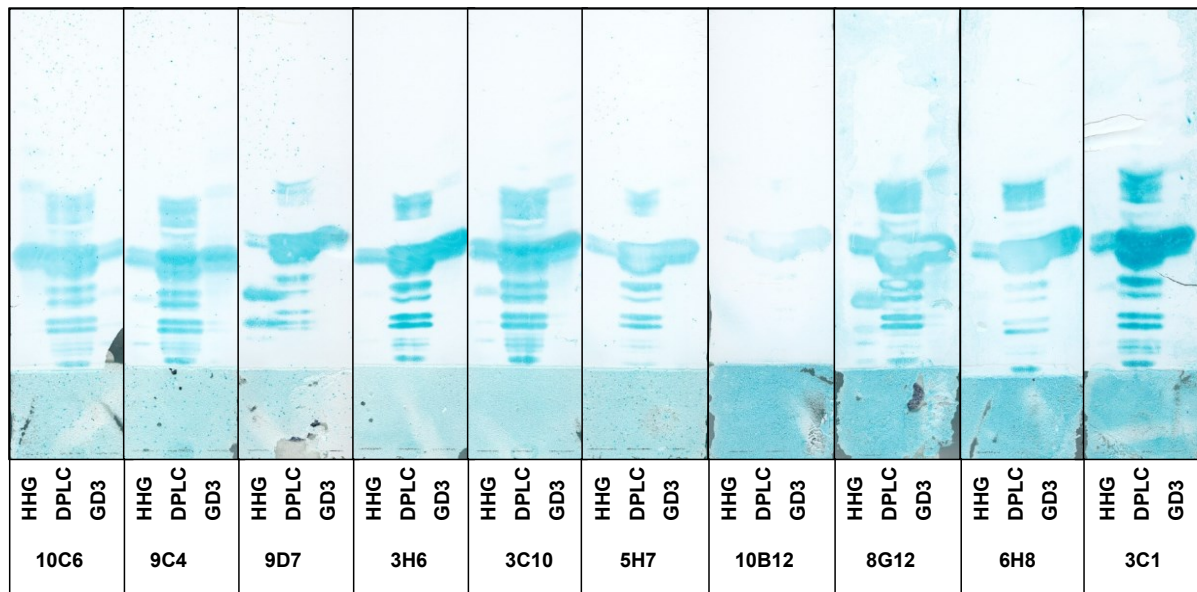


Abbildung 3.11: Test der Reaktivitäten der Hybridomüberstände der generierten Zellklone auf humane Hirnganglioside und Disialopolylactosaminylceramide in Overlaytechnik nach Oxidation *in situ*.

HHG: je 3 µl Gemisch humaner Hirnganglioside, DPLC: je 3 µl Disialopolylactosaminylceramid-Standard; GD3: je 1 µg.

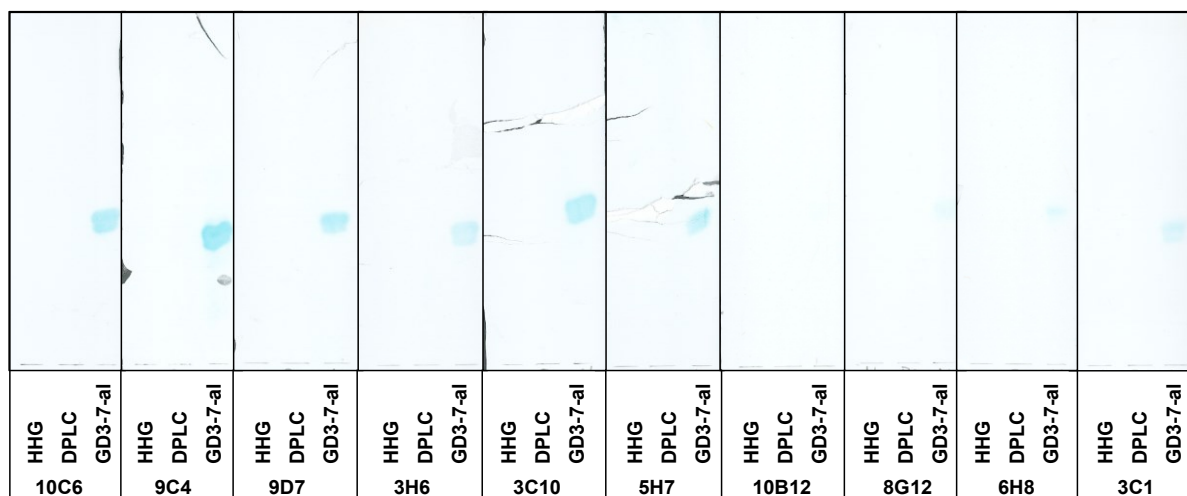


Abbildung 3.12: Test der Reaktivitäten der Hybridomüberstände der generierten Zellklone auf humane Hirnganglioside und Disialopolylactosaminylceramide in Overlaytechnik.

HHG: je 3 µl Gemisch humaner Hirnganglioside, DPLC: je 3 µl Disialopolylactosaminylceramid-Standard; GD3-7-al: je 1 µg.

Für die Untersuchung der Stoffklasse der oxidierten Ganglioside war vor allem wichtig, dass die Antikörper keine Kreuzreaktivität mit unverändertem GD3 zeigen.

Die Zellüberstände wurden daher in gleicher Weise auf HPTLC-Platten mit humanen Hirngangliosiden sowie Disialopolylactosaminylceramiden getestet, die nicht der Oxidation

unterzogen wurden. In Abb. 3.12 wird deutlich, dass keiner der Zellüberstände mit den nicht oxidierten GSL reagierte. Weder die GD3 enthaltenden humanen Hirnganglioside (1. Spur), noch die ebenfalls GD3 enthaltende Disialopolylactosaminylceramidpräparation (2. Spur) wurde angefärbt. Als Funktionskontrolle und Referenzbande wurde auf den nicht oxidierten HPTLC-Platten auf der 3. Spur GD3-7-al anstelle von GD3 eingesetzt.

Die Isotypbestimmung ergab für einige Zellüberstände IgG-, für die meisten IgM-Antikörper. Für die weitere Reklonierung wurden die Hybridome 10C6, 9D7 und 5H7 ausgewählt, welche alle der Klasse IgG angehörten und die interessanteste Spezifität zeigten.

Tabelle 3.1: Isotypen der GD3-7-al spezifischen Antikörper unterschiedlicher Hybridome

Klon	10C6	9C4	9D7	3H6	3C10	5H7	10B12	8G12	6H8	3C1
Isotyp	IgG2a	IgM	IgG2b	IgM	IgM	IgG2a	n.e.	n.e.	IgM	IgM

Der Klon 10C6 produzierte Antikörper mit den geringsten Nebenreaktivitäten auf oxidierten Hirngangliosiden. Zum Erhalt monoklonaler Zellen wurde 10C6 insgesamt viermal rekloniert, wobei nach jeder Reklonierung ein Screening stattfand. Dabei wurden keine Veränderungen in der Spezifität der Antikörper mehr beobachtet.

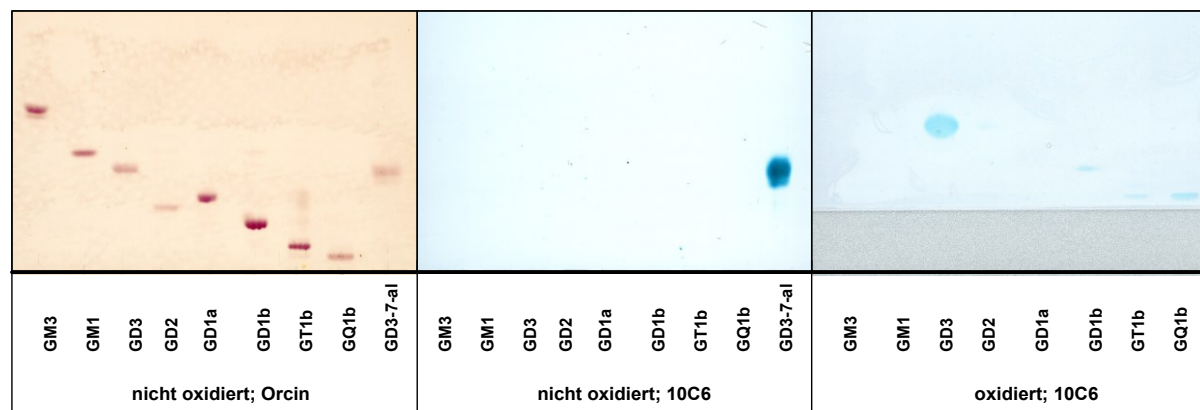


Abbildung 3.13: Spezifität des Überstands des Klons 10C6 getestet auf HPTLC.

Jede Spur enthält 2 µg des angegebenen Gangliosidstandards. Die mit Orcin gefärbte Platte (links) dient der Orientierung und zeigt die Laufhöhen der eingesetzten Gangliosidstandards. Die nicht oxidierte, mit 10C6 gefärbte Platte (Mitte) zeigt, dass der Antikörper nicht mit den unveränderten Gangliosiden reagiert, der mitgeführte GD3-7-al-Standard wird jedoch angefärbt. Die oxidierte, mit 10C6 gefärbte Platte (rechts) zeigt die Reaktionen des Antikörpers mit den *in situ* oxidierten Gangliosiden.

Die Spezifität des Hybridoms 10C6 wurde im Overlay-Verfahren auf TLC-Platten mit gereinigten Gangliosiden getestet (Abb. 3.13). Dabei wurde eine Platte ohne Oxidation belassen und eine zweite mit Natriumperjodat oxidiert. Bei der oxidierten Platte handelt es sich um eine HPTLC-Platte mit Konzentrationszone, daher ist die Laufhöhe aller Substanzen

etwas nach oben verschoben. Diese Platten zeichnen sich durch eine besonders hohe Oxidationsstabilität der Kieselgelbeschichtung aus und wurden deshalb für *in situ* Oxidationen eingesetzt.

Wie erwartet, ist keine Reaktion des Hybridomaüberstandes mit nicht oxidierten Gangliosiden zu verzeichnen.

Auf der oxidierten Platte findet sich an der Position von GD3 eine deutliche Bande. Dies zeigt, dass die Oxidation *in situ* zur Entstehung von GD3-7-al geführt hat. Weitere schwache Banden sind auf den Spuren 5, 6, 7 und 8 zu erkennen. Die Positionen der Banden lassen eine Identifizierung der Ganglioside zu. Die Bande in 5. Spur entspricht in der Laufhöhe GD3. Hier ist anzunehmen, dass es sich um eine Verunreinigung des GD2- Standards mit GD3 handelt. Oxidiertes GD2 wurde nicht angefärbt. Auf der 6. Spur binden die Antikörper in Laufhöhe von GD1b und in Spur 8 in der Laufhöhe von GQ1b. Die Bande auf Spur 7 liegt in ihrer Laufhöhe unter der von GT1b. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um eine Kontamination des GT1b-Standards mit GQ1b handelt.

Der monoklonale Antikörper 10C6 bindet also in erster Linie an oxidiertes GD3, reagiert aber auch mit oxidiertem GD1b und GQ1b sowie mit oxidierten Disialopolylactosaminylceramiden. Diesen Gangliosiden ist die terminale Struktur Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal gemeinsam. 10C6 bindet nur an die oxidierte Variante, nicht an die unveränderten Ganglioside. Der Aufbau der Glycanketten dieser Ganglioside ist in Abbildung 3.14 skizziert.

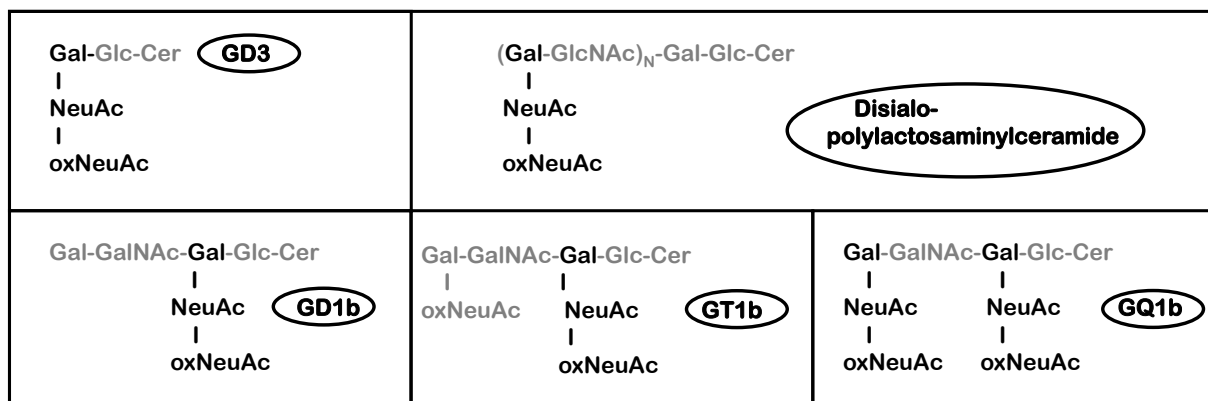


Abbildung 3.14: Strukturen der vom monoklonalen Antikörper 10C6 detektierten Ganglioside.

Dargestellt sind die Glycanketten der Disialoganglioside GD3 und GD1b sowie der disialylierten Polylactosaminylceramide mit repetitiven Strukturen, des Trisialogangliosids GT1b und des Quatrosialogangliosids GQ1b jeweils mit als oxidiert symbolisierter terminaler Sialinsäure.

Die Überstände des Hybridoms 10C6 mit Antikörpern des Isotyps IgG2a wurden für alle weiteren Experimente eingesetzt.

3.2.5 Sensitivität der glycolipidspezifischen monoklonalen Antikörper

Die Nachweisgrenzen der glycolipidspezifischen mAbs wurden durch immunchemische Overlay-Färbungen auf HPTLC-Platten mit anschließender densitometrischer Bestimmung der Absorption der Banden ermittelt.

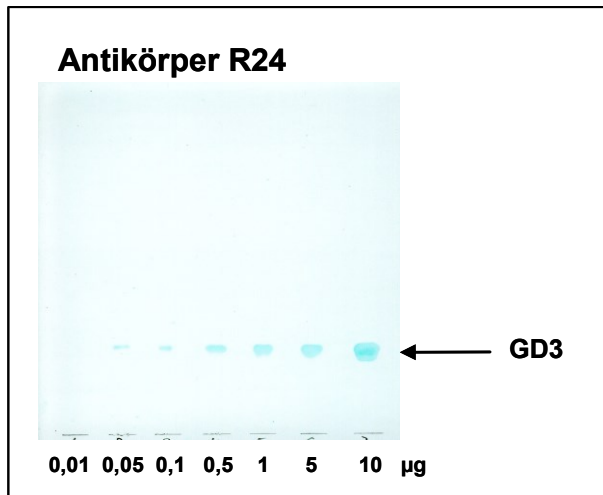


Abbildung 3.15: Overlay-Färbung auf HPTLC mit dem GD3-spezifischen Antikörper R24.

Die mit den angegebenen Antigenmengen beladene Platte wurde nach der Chromatographie mit Polyisobutylmethacrylat beschichtet und mit dem Kulturüberstand des Hybridoms R24 inkubiert.

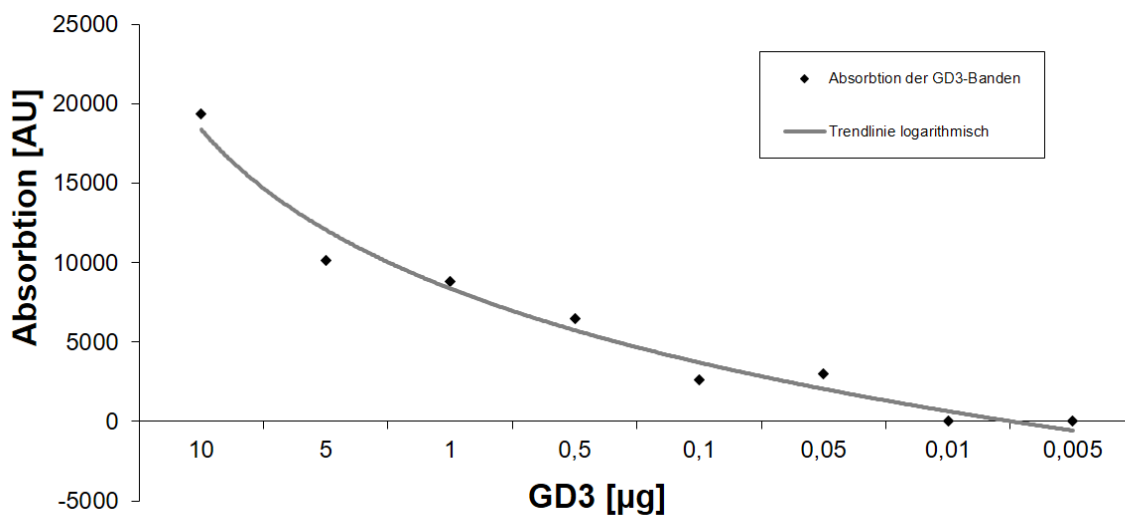


Abbildung 3.16: Densitometrischer Scan der mit R24 inkubierten Platte.

Die in Abb. 3.15 dargestellte Platte wurde mit dem Shimadzu-Scanner bei 580nm im *reflection*-Modus gemessen.

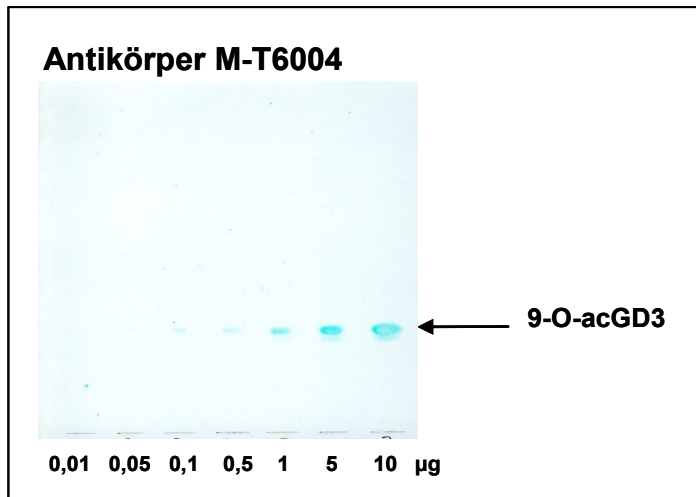


Abbildung 3.17: Overlay-Färbung auf HPTLC mit dem 9-O-acGD3-spezifischen Antikörper M-T6004.

Die mit den angegebenen Antigenmengen beladene Platte wurde nach der Chromatographie mit Polyisobutylmethacrylat beschichtet und mit dem Kulturüberstand des Hybridoms M-T6004 inkubiert.

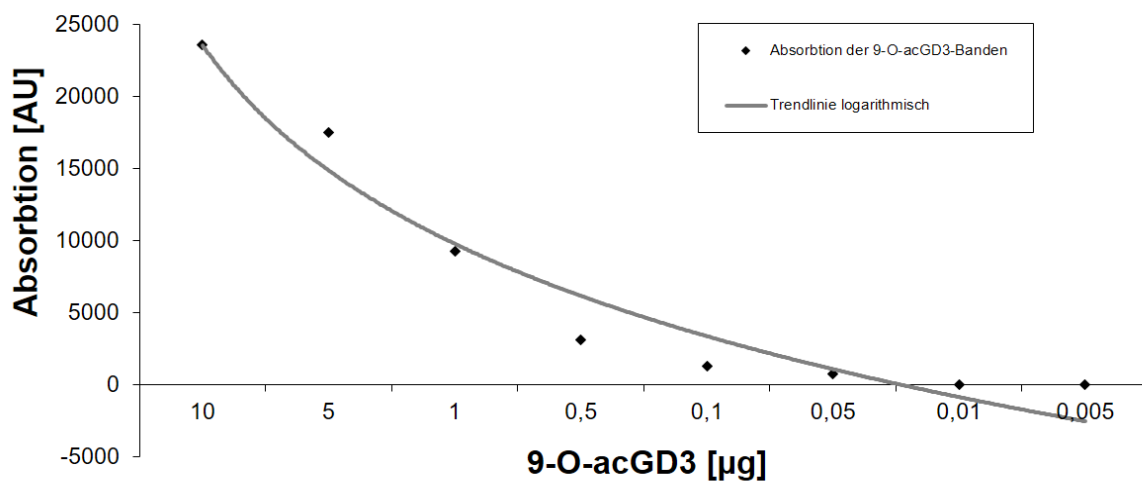


Abbildung 3.18: Densitometrischer Scan der mit M-T6004 inkubierten Platte.

Die in Abb. 3.17 dargestellte Platte wurde mit dem Shimadzu-Scanner bei 580nm im *reflection*-Modus gemessen.

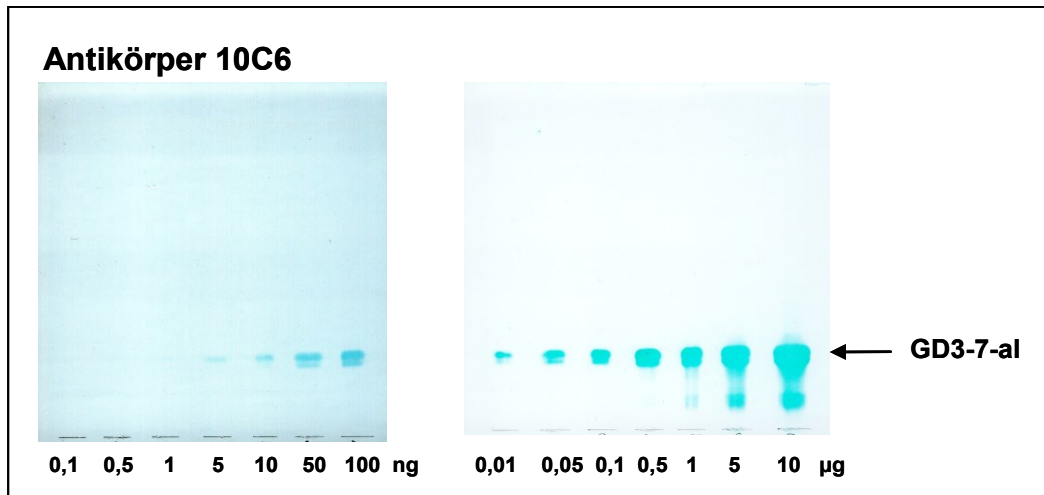


Abbildung 3.19: Overlay-Färbung auf HPTLC mit dem GD3-7-al-spezifischen Antikörper 10C6.

Die mit den angegebenen Antigenmengen beladene Platte wurde nach der Chromatographie mit Polyisobutylmethacrylat beschichtet und mit dem Kulturüberstand des Hybridoms 10C6 inkubiert.

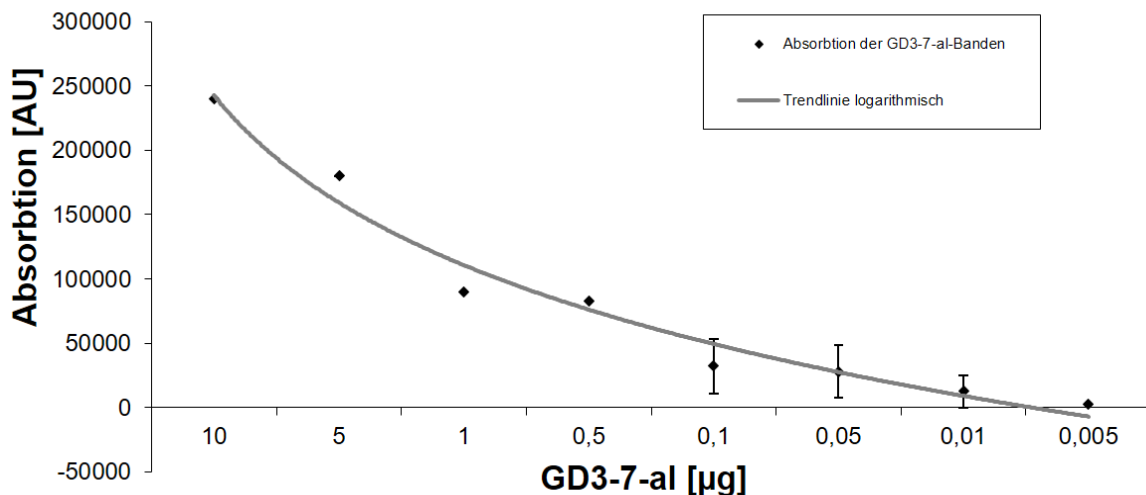


Abbildung 3.20: Densitometrischer Scan der mit 10C6 inkubierten Platte.

Die in Abb. 3.19 dargestellten Platten wurden mit dem Shimadzu-Scanner bei 580nm im *reflection*-Modus gemessen.

Mit dem Antikörper R24 (IgG3) resultiert eine minimale detektierbare Menge von 0,05 µg GD3 (Abb 3.15, Abb. 3.16), mit M-T6004 0,1 µg 9-O-acGD3 in einer mit bloßem Auge sichtbaren Bande (Abb. 3.17). Die densitometrische Messung ergab für beide Antikörper Absorptionswerte in gleicher Größenordnung.

Mit dem neuen GD3-7-al-spezifischen Antikörper 10C6 ergibt eine Menge von 5 ng GD3-7-al auf HPTLC-Platten eine sichtbare Bande (Abb.3.19). Die densitometrischen Messwerte der Absorption lagen im Vergleich zu den Ergebnissen von R24 und M-T6004 etwa um den Faktor 10 höher (Abb. 3.20).

Eine 1:10 Verdünnung der Kulturüberstände aller drei Hybridome führte nicht zu einer Abnahme der Intensität der Färbungen. Die Antikörper lagen demzufolge im Überschuss in den Überständen vor. Die Sensitivität wurde also von der Affinität bestimmt, die Konzentration stellte keinen limitierenden Faktor dar.

3.2.6 Nutzbarkeit des Antikörpers 10C6 für die Durchflusszytometrie

Um zu testen, ob der Antikörper auch für die Detektion mittels Durchflusszytometrie geeignet ist, wurde nach einem geeigneten Testsystem gesucht. Da HL60-Zellen in Suspension leicht zu kultivieren sind, wurden diese Zellen für den Test eingesetzt.

Die Oberflächenfärbung von HL60, welche direkt nach der Entnahme aus der Kulturflasche mit 10C6 gefärbt wurden, ergab zunächst ein negatives Ergebnis.

Wurden die Zellen mit GD3-7-al vorbehandelt, ließ sich die Präsenz dieses Glycolipids auf der Oberfläche durch eine Färbung mit 10C6 am Durchflusszytometer nachweisen. Die Messung ergab eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit.

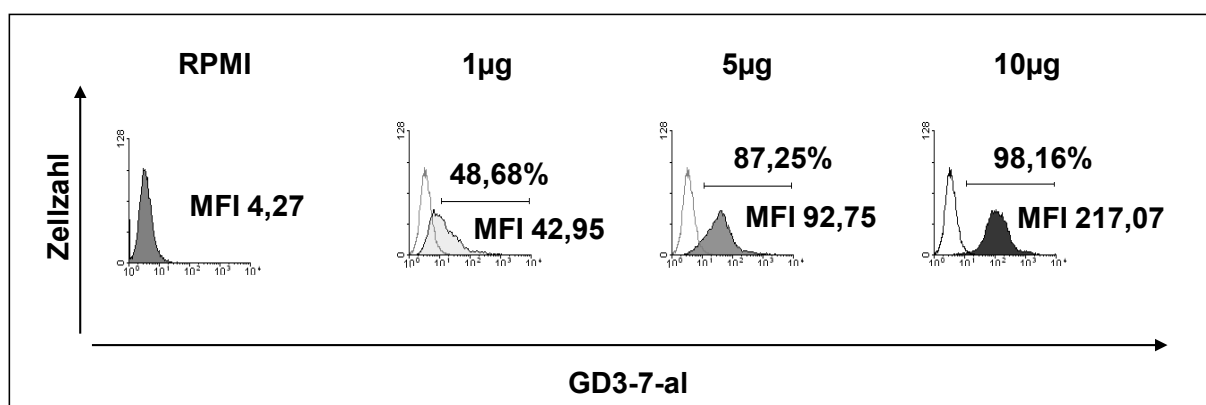


Abbildung 3.21: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen.

Jeweils 1×10^6 HL60-Zellen wurden eine Stunde lang mit 1 ml RPMI Medium mit der entsprechenden Menge Gangliosid bei 37 °C inkubiert, mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

In den so behandelten HL60-Zellen konnte im Vergleich zur Mediumkontrolle keine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden. Der Anteil der mit der SubG1-Methode ermittelten apoptotischen Zellen lag zum Zeitpunkt der Zellernte sowohl in der Kontrolle, als auch nach der Inkubation mit GD3-7-al unter 25 %.

3.3 Apoptoseinduktion mit unterschiedlichen GD3-Derivaten an Molt-4-Zellen

Ausgehend von der Vermutung, dass GD3-7-al ein proapoptotisches Effektormolekül sein könnte, wurde versucht, in Molt-4 Zellen durch die Inkubation mit verschiedenen GD3-Derivaten Apoptose auszulösen. Molt-4-Zellen wurden ausgewählt, weil sie für ihre Fähigkeit bekannt sind, GD3 zu O-acetylieren und sich so der GD3-vermittelten Apoptose zu entziehen.

Zunächst wurden die Molt-4-Zellen auf ihre prinzipielle Fähigkeit zur 9-O-Acetylierung getestet. Da die Ganglioside einer Zelle vor allem auf der Membranoberfläche zu finden sind, wurde dies durch eine Färbung mit gangliosidspezifischen mAb und der anschließenden Messung mittels Durchflusszytometrie realisiert. Darüber hinaus wurde der Lipidextrakt von Molt-4-Zellen auf das Vorhandensein von 9-O-acGD3 auf HPTLC überprüft.

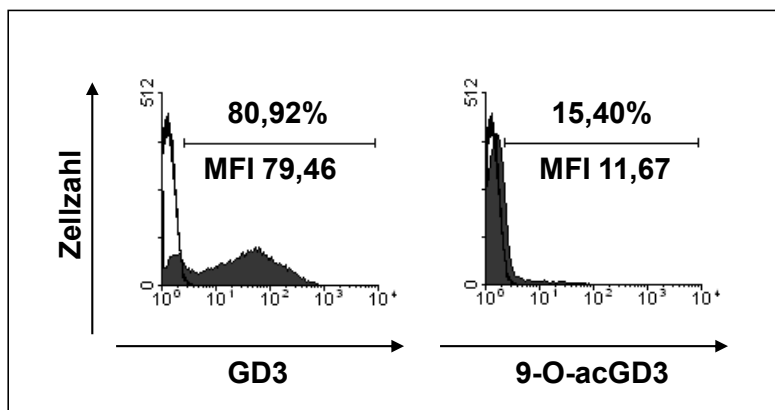


Abbildung 3.22: Durchflusszytometrische Bestimmung der Ausprägung von GD3 und 9-O-acGD3 auf der Oberfläche von Molt-4-Zellen.

Molt-4-Zellen wurden mit R24 (anti-GD3-Antikörper) bzw. mit M-T6004 (anti-9-O-acGD3-Antikörper) sowie FITC-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Die für das Vorhandensein der Acetyltransferase typische Oberflächenausprägung von 9-O-acGD3 konnte in den verwendeten Zellen mit der Durchflusszytometrie unter Verwendung des Antikörpers M-T6004 bei einem Teil der Zellen von 15,4 % nachgewiesen werden. Über 80 % der Zellen besitzen auf der Oberfläche GD3, welches mit dem Antikörper R24 angefärbt werden konnte.

Mit der Overlay-Färbetechnik konnte unter Verwendung des Antikörpers M-T6004 eine Bande mit der Mobilität von 9-O-acGD3 detektiert werden.

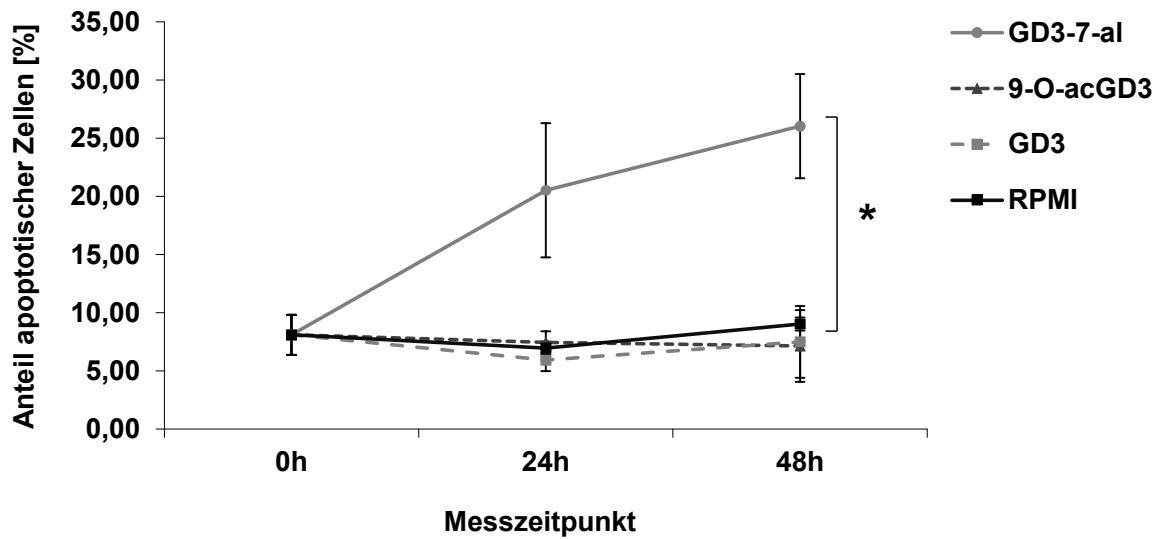


Abbildung 3.23: Apoptoseraten von Molt-4-Zellen nach Inkubation mit GD3 und seinen Derivaten.

Zu den Messzeitpunkten wurde ein Teil der Zellen entnommen und die Apoptoserate mittels durchflusszytometrischer SubG1-Analyse ermittelt.

Die Zelllinie Molt-4 wurde mit den Gangliosiden GD3, 9-O-acGD3 oder GD3-7-al in Konzentrationen von je 300 μ M im Medium inkubiert und die Apoptoseraten zu den angegebenen Zeitpunkten durch SubG1-Analyse ermittelt.

Die Ganglioside GD3 und 9-O-acGD3 führen in dieser Zelllinie nicht zu einer höheren Apoptoserate als RPMI-Standardmedium. Die Inkubation der Zellen mit GD3-7-al führt hingegen zu einer signifikant ($p < 0,02$) erhöhten Apoptoserate im Vergleich zu RPMI-Standardmedium, GD3 sowie 9-O-acGD3.

Als Positivkontrolle eingesetztes Ceramid der Konzentration 100 μ M im Medium führte bereits nach 24 Stunden zu einem vollständigen Absterben der Zellen.

3.4 Darstellung von GD3-7-al *in vitro* unter Bedingungen des oxidativen Stresses

In der Zelle auftretende Oxidationsbedingungen sind abweichend von denen, mit welchen sehr effizient GD3-7-al hergestellt werden konnte. Die Oxidation mit Natriumperjodat stellt ein artifizielles System dar, welches *in vivo* nicht zu erwarten ist.

Um zu prüfen, ob GD3-7-al in der Zelle unter oxidativen Stressbedingungen entstehen kann, wurde GD3 *in vitro* freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt.

Dabei genügte es nicht, das Gangliosid mit Wasserstoffperoxid zu inkubieren, sondern die Anwesenheit von Eisen-II-Ionen stellte sich als Voraussetzung einer erfolgreichen Oxidation heraus.

Es kann also angenommen werden, dass im Sinne einer Fenton-Reaktion durch das Entstehen von Hydroxylradikalen eine Umsetzung von GD3 zu GD3-7-al möglich ist.

In Abhängigkeit von der Konzentration der Reagenzien konnte GD3 umgesetzt werden. Die Laufhöhe der Bande des Produktes entspricht der des GD3-7-al-Standards und das Produkt konnte mit dem Hybridomaüberstand von 10C6 angefärbt werden. Somit lässt sich das Produkt eindeutig als GD3-7-al identifizieren.

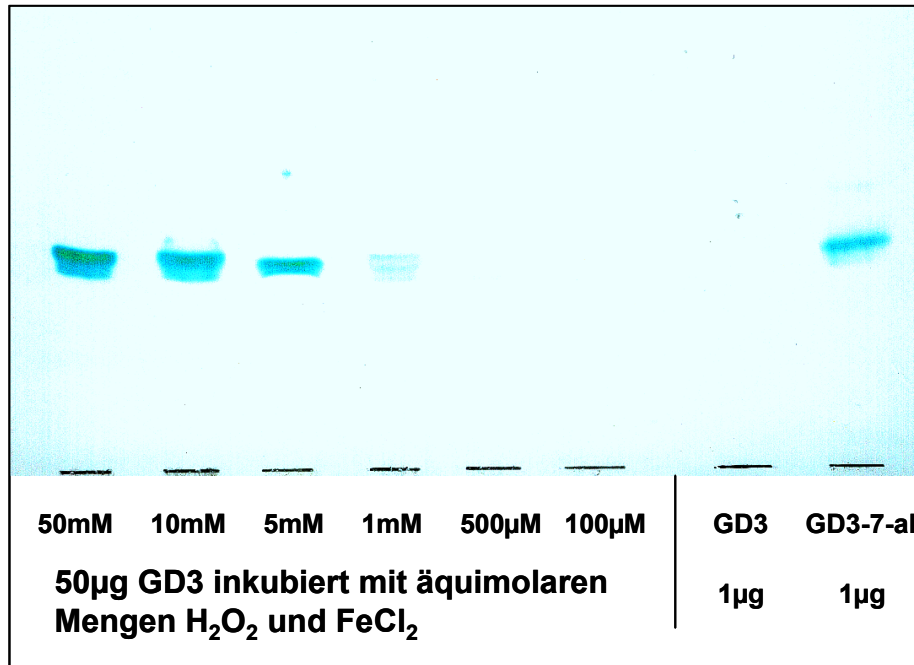


Abbildung 3.24: HPTLC des Produktes der *in vitro* Oxidation von GD3 mit ROS gefärbt mit 10C6 in Overlaytechnik.

Jede Spur enthält 10 % des Reaktionsproduktes aus 50 µg getrocknetem GD3 oxidiert mit einem äquimolaren Gemisch aus H₂O₂ und FeCl₂ in folgenden Konzentrationen: 50 mM; 10 mM; 5 mM; 1 mM; 500 µM; 100 µM; Standards: 1 µg GD3; 1 µg GD3-7-al.

3.5 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd in biologischen Materialien

3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit den Antikörpern R24, M-T6004 und 10C6 auf verschiedenen Primatengeweben

Unterschiedliche Primatengewebe wurden im Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz mit den monoklonalen Antikörpern R24, M-T6004 sowie mit 10C6 zur Detektion der drei verschiedenen GD3-Derivate gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt und aufgenommen. Dabei wurden kommerziell erhältliche Gewebeschnitte verwendet, wie sie in der Autoimmundiagnostik zum Einsatz kommen.

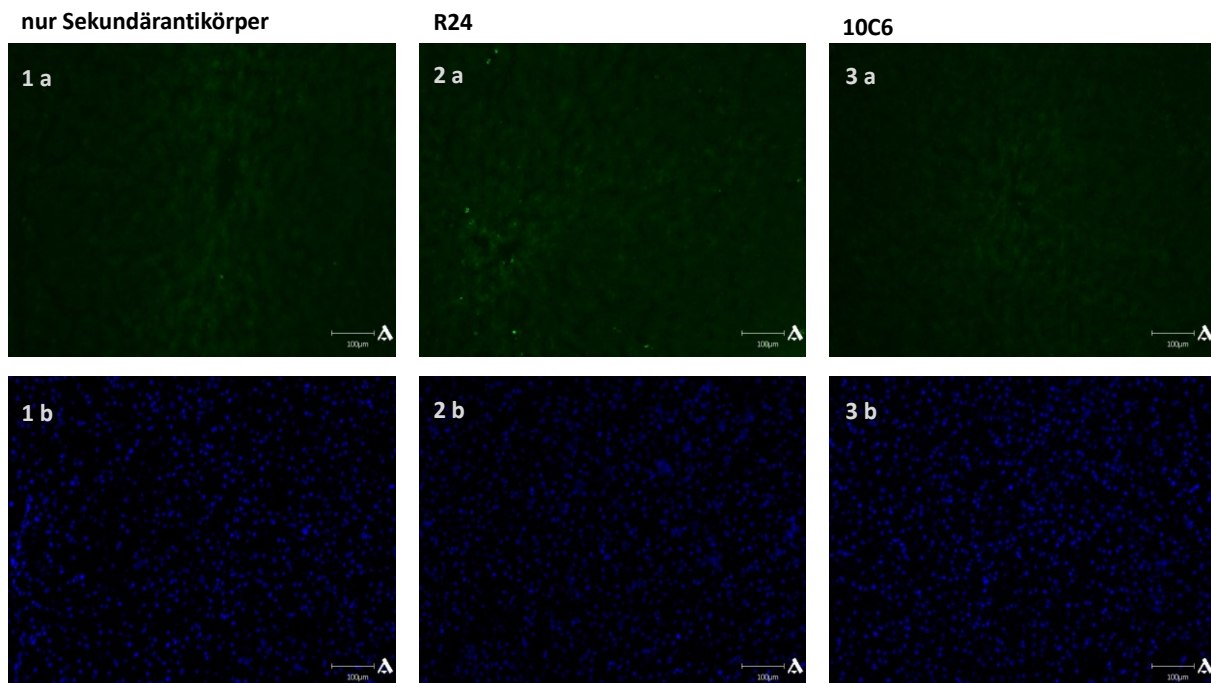


Abbildung 3.25: Negatives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz an Lebergewebe (Primat).

1: Färbung nur mit Sekundärantikörper; 2: Färbung mit R24; 3: Färbung mit 10C6; alle Aufnahmen im FITC-Kanal (a) wurden mit einer Belichtungszeit von 300 ms aufgenommen, die Aufnahmen im DAPI-Kanal (b) erfolgten mit 25 ms

Abb. 3.25 zeigt exemplarisch ein negatives Resultat an Lebergewebe. Die in Tabelle 3.2 aufgeführten Intensitäten sind mit denen in den Abbildungen 3.25, 3.26 und 3.27 vergleichbar.

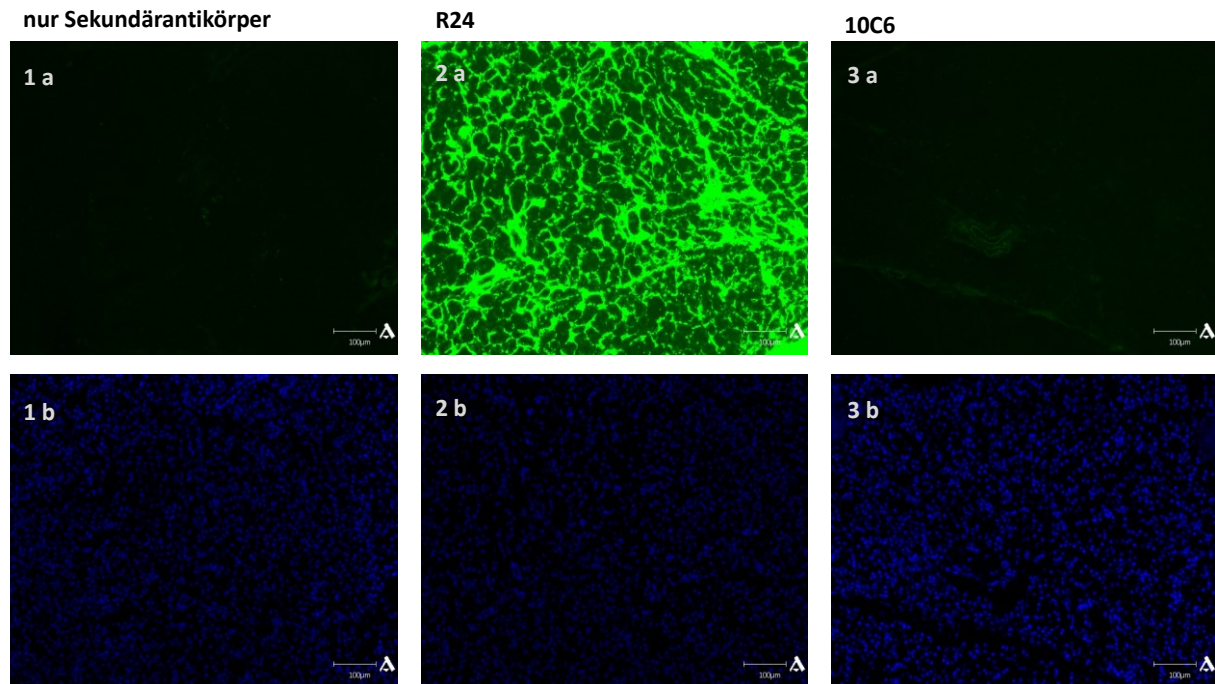


Abbildung 3.26: Stark positives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz an Pankreasgewebe (Primat) bei Färbung mit R24 (anti-GD3).

1: Färbung nur mit Sekundärantikörper; 2: Färbung mit R24; 3: Färbung mit 10C6; alle Aufnahmen im FITC-Kanal (a) wurden mit einer Belichtungszeit von 300 ms aufgenommen, die Aufnahmen im DAPI-Kanal (b) erfolgten mit 25 ms.

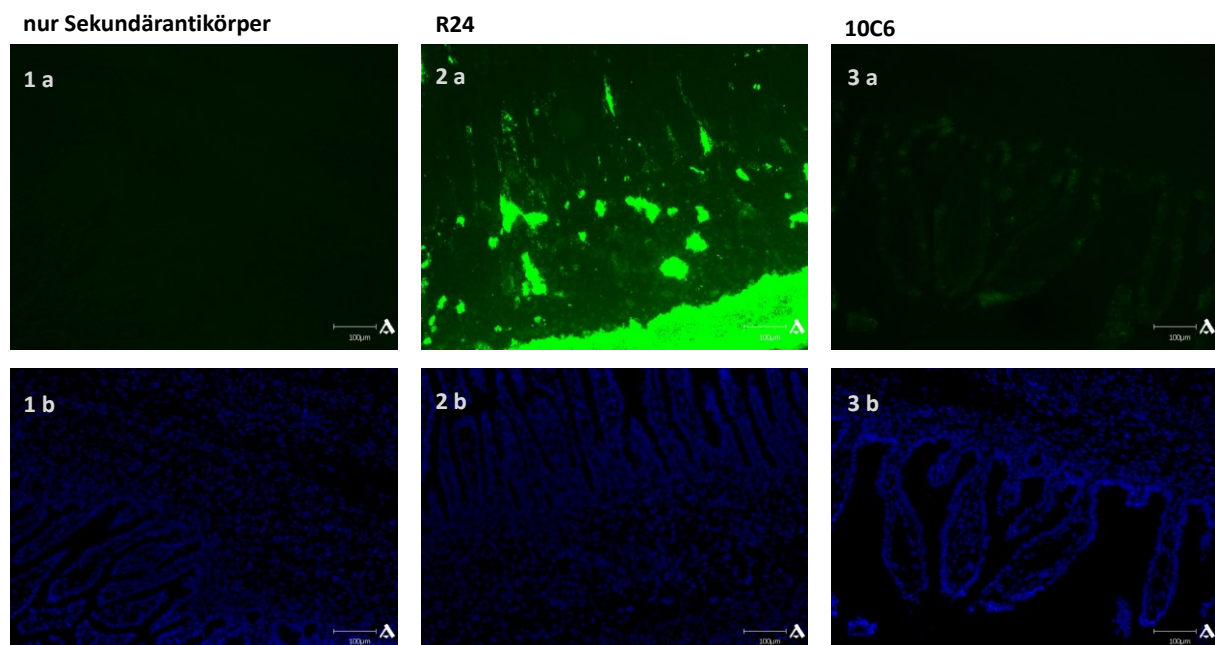


Abbildung 3.27: Positives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz an fötalem Darmgewebe (Primat) bei Färbung mit R24 (anti-GD3) sowie schwache Fluoreszenz bei Färbung mit GD3-7-al (anti-GD3).

1: Färbung nur mit Sekundärantikörper; 2: Färbung mit R24; 3: Färbung mit 10C6; alle Aufnahmen im FITC-Kanal (a) wurden mit einer Belichtungszeit von 300 ms aufgenommen, die Aufnahmen im DAPI-Kanal (b) erfolgten mit 25 ms.

Tabelle 3.2: Übersicht der Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz an Primatengeweben

Gewebe	Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz		
	R24 (anti-GD3)	M-T6004 (anti-9-O-acGD3)	10C6 (anti-GD3-7-al)
Großhirn Primat	schwach positiv	negativ	negativ
Kleinhirn Affe	stark positiv	negativ	negativ
Peripherer Nerv Primat	negativ	negativ	negativ
Herz Primat	positiv	negativ	negativ
Bauchhaut Primat	stark positiv	negativ	negativ
Schilddrüse Primat	positiv	negativ	negativ
Parotis Affe	stark positiv	schwach positiv	negativ
Niere Primat	schwach positiv	negativ	negativ
Nebennierenrinde Primat	stark positiv	negativ	negativ
Leber Primat	negativ	negativ	negativ
Magen Affe	stark positiv	negativ	negativ
Pankreas Primat	stark positiv	schwach positiv	negativ
Darm fetal Primat	positiv	negativ	schwach positiv
Milz fetal Primat	positiv	negativ	schwach positiv
Plazenta	positiv	negativ	negativ

In zahlreichen Geweben wird eine starke Anfärbung mit R24 erzielt. Hierfür können GD3 oder Moleküle mit vergleichbarer Glycanstruktur verantwortlich sein. Nur in wenigen der untersuchten Präparate konnten Moleküle mit 9-O-acetylierten oder oxidierten Sialinsäuren nachgewiesen werden.

In fetalem Gewebe von Darm (Abb. 3.27) und Milz kam es zu einer schwachen Anfärbung mit dem Antikörper 10C6, was für das Vorhandensein eines oxidierten Derivats von GD3 oder einer anders gebundenen Glycanstruktur mit einer terminalen Kette von oxidiertem Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal spricht. Der Antikörper M-T6004 führt in den Präparaten von Pankreas (Abb. 3.26) und Speicheldrüse zu einer geringfügigen Anfärbung. Hier kann das Derivat 9-O-acGD3 oder eine ähnliche 9-O-acetylierte Struktur vorkommen.

Da die Färbungen mit 10C6 und M-T6004 lediglich schwach waren und sich nicht über klar abgrenzbare Bereiche der Gewebe erstreckten, können diese nur als Hinweise auf ein mögliches Vorhandensein der Antigene betrachtet werden.

3.5.2 Immunhistochemie mit den Antikörpern R24, M-T6004 und 10C6 auf humanem Darmgewebe

Darüberhinaus wurde in frischem humanem Darmgewebe mittels immunhistochemischer Färbung nach den Antigenen gesucht.

Mit der Methode der Immunhistochemie gefärbte Gewebeschnitte von frischem humanem Darmgewebe, welches im Rahmen einer Tumoresektion gewonnen wurde, zeigte keine Reaktivität bei der Färbung mit R24 und mit 10C6. Die gleich behandelte Kontrolle, bestehend aus SK-Mel-23, welche GD3 auf der Oberfläche tragen, wurde hingegen deutlich angefärbt. Mit NaIO_4 behandelte SK-Mel-23-Zellen dienten als Positivkontrolle für die Färbung mit 10C6 mit welchem GD3-7-al nachgewiesen werden kann.

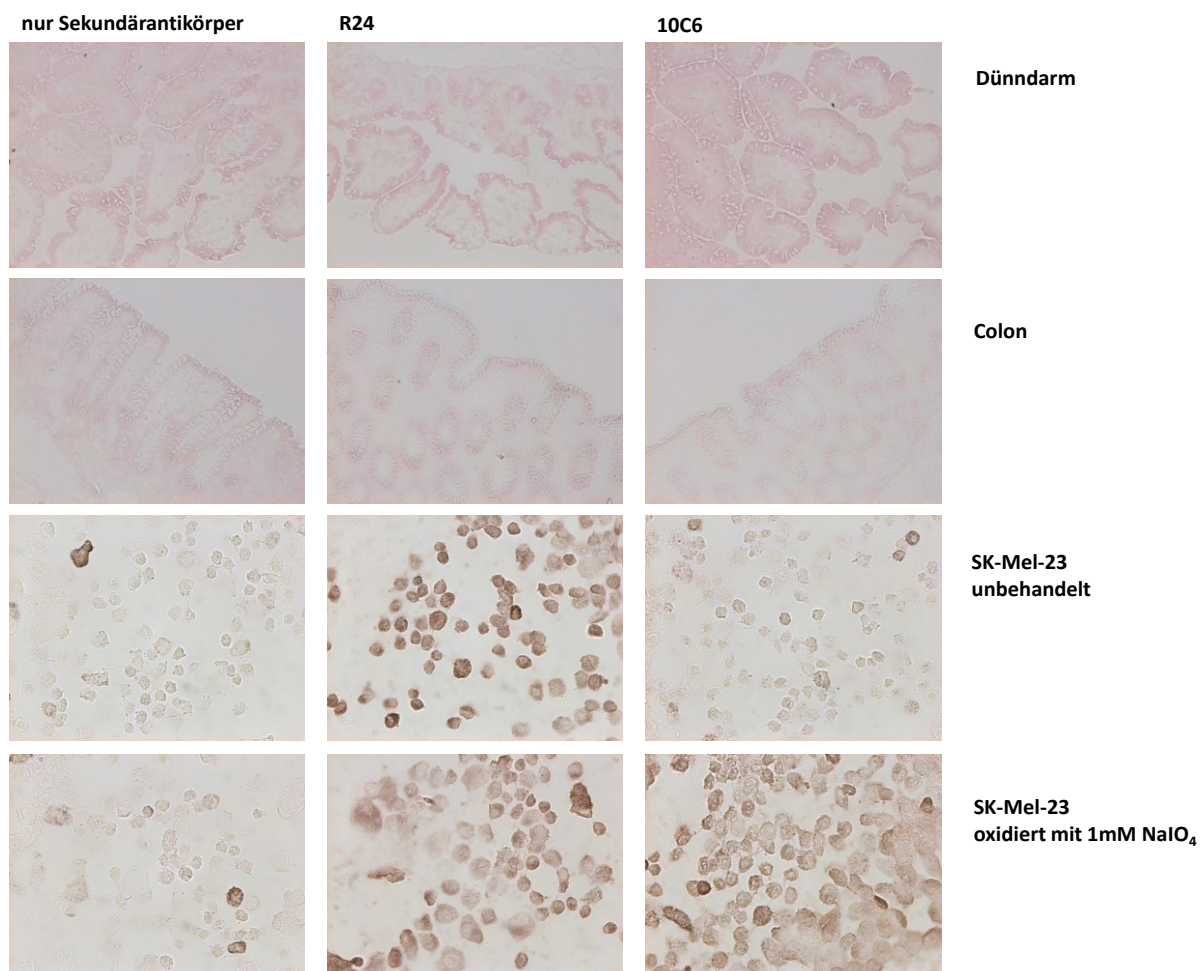


Abbildung 3.28: Immunhistochemische Färbung von humanem Dünndarm, Colon und SK-Mel-23-Zellen.

Gewebeschnitte wurden mit modifizierter ABC-Methode gefärbt und zeigten mit keinem Antikörper eine Reaktion. SK-Mel-23 Zellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und in gleicher Weise gefärbt. Eine dunkelbraune Färbung zeigt die Bindung des Antikörpers 10C6 an.

3.5.3 GD3-Metabolite im Lipidextrakt verschiedener Tumorzelllinien

Um das Vorkommen von GD3-7-al zu untersuchen, wurden die Lipidextrakte verschiedener Zelllinien analysiert. Dabei wurden Zellextrakte von jeweils 1×10^7 Zellen auf HPTLC chromatografiert und sowohl mit Orcin als auch mit den drei glycolipidspezifischen Antikörpern angefärbt. Die Laufhöhen der Banden und die Bandenintensität der auf HPTLC-Platten aufgetrennten Lipidextrakte wurden mit definierten Gangliosidstandards bekannter Konzentration verglichen.

Diese Technik bietet den Vorteil, dass über die Mobilität der Banden auf den HPTLC-Platten in Kombination mit der Anfärbbarkeit durch bestimmte Antikörper eine genaue Identifizierung von Gangliosidderivaten möglich ist und eine semiquantitative Abschätzung der Menge vorgenommen werden kann.

Da GD3 mit dem programmierten Zelltod assoziiert ist, wurden die Apoptoseraten der zur Lipidextraktion herangezogenen Zellpopulationen über die SubG1-Analyse ermittelt. Der Anteil apoptotischer Zellen lag in allen Proben unter 20 %.

Abbildung 3.29 gibt eine Übersicht über die erzielten Ergebnisse. Diese stehen exemplarisch für mindestens zwei Versuche. In einigen Fällen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten abweichende Ergebnisse erzielt. In diesen Fällen ist jeweils der Lipidextrakt gezeigt, der das Vorhandensein der Ganglioside nachweist.

In fast allen untersuchten Zelllinien konnte GD3 gefunden werden. Lediglich die verwendete Jurkat-Variante enthielt kein GD3 sowie auch keines der übrigen Ganglioside.

Die Pankreasadenokarzinomzelllinie Capan-1 sowie alle drei Melanomzelllinien (Ma-Mel-11, Ma-Mel-95 und SK-Mel-23) zeigten neben der Ausprägung von GD3 auch das acetylierte Derivat 9-O-acGD3. In der Zelllinie Molt-4, einer Linie aus T-Zell-Lymphoblasten wurde GD3 und 9-O-acGD3 nur in sehr schwacher Ausprägung gefunden. Die Zelllinien HEp-2, HL60 und T47D enthielten neben GD3 auch das oxidierte Derivat GD3-7-al.

In den Fällen der promyeloblastischen Leukämiezelllinie HL60 sowie der Mammakarzinomzelllinie T47D wurde in jeweils einem weiteren Versuch ein vom ersten, in der Tabelle dargestellten Ergebnis abweichendes Resultat ermittelt. Das zweite Experiment erbrachte ein negatives Ergebnis für GD3-7-al in HL60-Zellen. T47D-Zellen wurden in einem Versuch zu Beginn der Kulturdauer komplett negativ für alle Ganglioside getestet. In Apoptoserate und äußeren Bedingungen gab es keine erkennbaren Unterschiede.

In keiner der untersuchten Zelllinien konnte gleichzeitig 9-O-acGD3 und GD3-7-al nachgewiesen werden. Neben GD3 wurde stets nur ein weiteres Derivat ausgeprägt.

Da der GD3-7-al spezifische Antikörper 10C6 eine wesentlich höhere Sensitivität aufweist, als die beiden anderen Antikörper, wird hier bereits eine sehr geringe Gangliosidmenge als positiv detektiert.

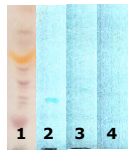
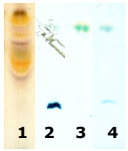
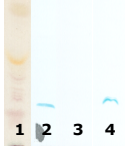
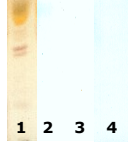
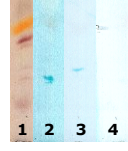
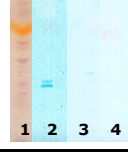
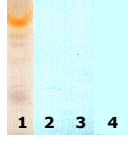
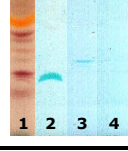
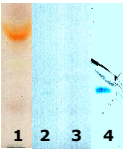
Zelllinie und deren Ursprung	HPTLC	GD3	9-O-acGD3	GD3-7-al
Capan-1 Pankreas-adenokarzinom		positiv	schwach positiv	negativ
HEp-2 Larynxkarzinom		positiv	negativ	schwach positiv
HL60 Promyeloblastische Leukämie		positiv	negativ	positiv
Jurkat Akute T-Zell-Leukämie		negativ	negativ	negativ
Ma-Mel-11 Melanom		positiv	schwach positiv	negativ
Ma-Mel-95 Melanom		positiv	schwach positiv	negativ
Molt-4 Akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie		schwach positiv	schwach positiv	negativ
SK-Mel-23 Melanom		positiv	positiv	negativ
T47D Duktales Mammakarzinom		schwach positiv	negativ	positiv

Abbildung 3.29: Nachweis der GD3-Derivate im chromatographisch aufgetrennten Lipidextrakt von Zelllinien.

Die für jede Zelllinie abgebildeten Spuren 1-4 zeigen jeweils den Ausschnitt einer HPTLC-Platte mit der Auftragstelle des entsprechenden Zellextraktes.

1: Orcinfärbung auf HPTLC; 2: R24-Färbung auf HPTLC zum Nachweis von GD3; 3: M-T6004-Färbung zum Nachweis von 9-O-acGD3; 4: 10C6-Färbung zum Nachweis von GD3-7-al.

3.5.4 GD3-Metabolite in Tumorgeweben

Ergänzend zur Färbung von Tumorzelllinien wurden kommerzielle Gewebeschnitte von Tumorgeweben mit der Methode der Indirekten Immunfluoreszenz (IIF) untersucht. Exemplarisch ist hierfür in Abbildung 3.30 die Färbung des Gewebeschnittes eines Mammakarzinoms mit den Antikörpern 10C6 und R24 dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller IIF an Tumorgeweben ist in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Alle drei verwendeten Präparate enthalten Bereiche, die mit dem Antikörper R24 stark angefärbt werden. Hier ist also das Disialogangliosid GD3 oder eine mit R24 reagierende, dem GD3 ähnliche Glycanstruktur zu vermuten.

In Colonkarzinom und Lebermetastase sind weder 9-O-acetylierte Strukturen noch Bereiche mit oxidierten Sialinsäuren zu finden.

Lediglich der Schnitt des Mammakarzinoms weist über die R24-Färbung hinaus schwache Färbungen mit den beiden Antikörpern M-T6004 und 10C6 auf, die etwas über das Maß der unspezifischen Färbung durch den Sekundärantikörper hinausgehen.

Leider waren die Gewebe nicht für eine Lipidextraktion mit anschließender HPTLC verfügbar. Über die Laufhöhe der Banden und die Anfärbbarkeit mit den gangliosidspezifischen Antikörpern wären GD3, 9-O-acGD3 und GD3-7-al eindeutig identifizierbar. So kann nicht mit Sicherheit der Nachweis von Glycolipiden als Zielstruktur erbracht werden, sondern lediglich das Vorhandensein einer durch die Antikörper erkannten Glycanstruktur.

Da 10C6 eine 10-fach höhere Sensitivität aufweist als die beiden anderen glycolipidspezifischen Antikörper, zeigt die schwache Anfärbung nur eine minimale Menge eines passenden Antigens im Gewebe an.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz auf Tumorgewebe

Tumorgewebe	Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz		
	R24 (anti-GD3)	M-T6004 (anti-9-O-acGD3)	10C6 (anti-GD3-7-al)
Colonkarzinom	positiv	negativ	negativ
Lebermetastase	stark positiv	negativ	negativ
Mammakarzinom	stark positiv	schwach positiv	schwach positiv

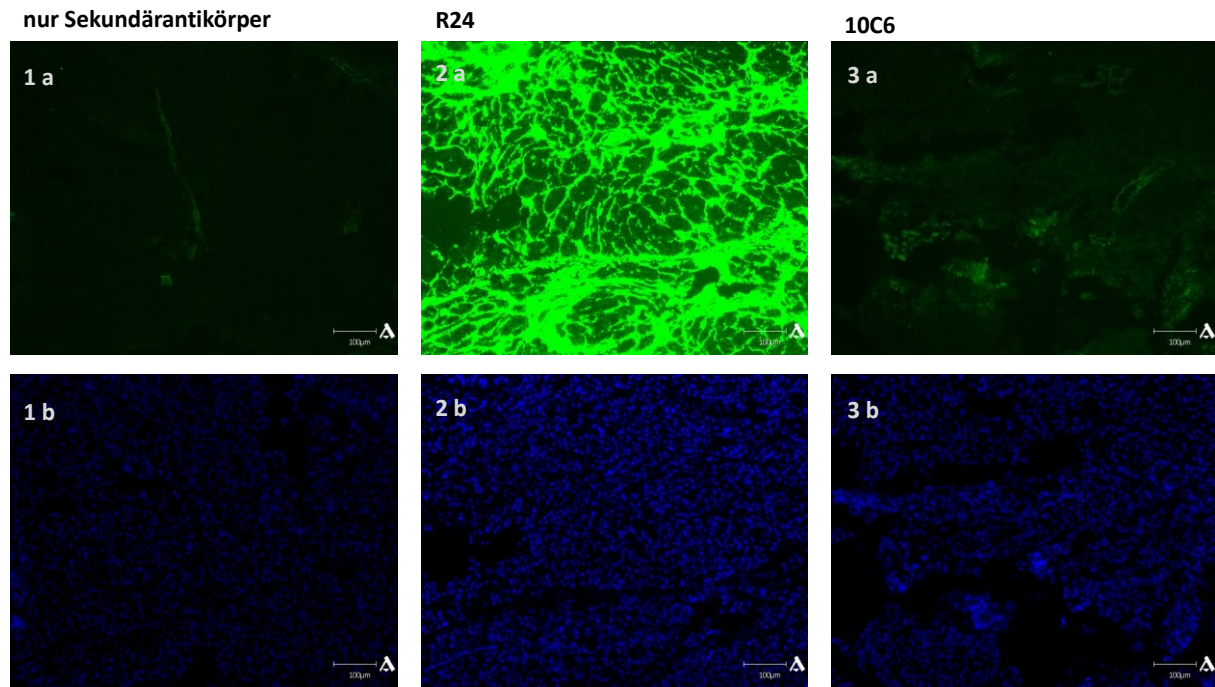


Abbildung 3.30: Positives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz am Gewebeschnitt eines Mammakarzinoms bei Färbung mit R24 (anti-GD3) sowie schwache Fluoreszenz bei Färbung mit GD3-7-a1 (anti-GD3).

1: Färbung nur mit Sekundärantikörper; 2: Färbung mit R24; 3: Färbung mit 10C6; alle Aufnahmen im FITC-Kanal (a) wurden mit einer Belichtungszeit von 300 ms aufgenommen, die Aufnahmen im DAPI-Kanal (b) erfolgten mit 25 ms;

3.5.5 Nachweis von GD3-7-Aldehyd in peripheren mononukleären Blutzellen

Da das Gangliosid GD3 und seine beiden O-acetylierten Derivate 9-O- und 7-O-acetylGD3 als Oberflächenmarker CD60a, b und c beschrieben sind, sollte ermittelt werden, ob es Zellpopulationen in den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) gibt, in denen GD3-7-Aldehyd vorkommt.

Dazu wurden die PBMCs aus dem Blut gesunder Spender über Dichtegradientenzentrifugation isoliert und sowohl mittels Lipidextraktion mit anschließender chromatographischer Trennung auf HPTLC-Platten als auch mittels Durchflusszytometrie untersucht.

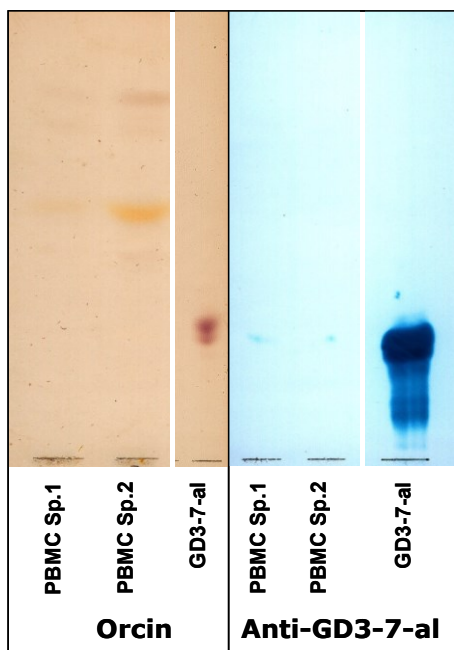


Abbildung 3.31: Untersuchung des Lipidextraktes von peripheren mononukleären Blutzellen zweier Spender auf HPTLC in Overlaytechnik.

Orcin: Färbung mit Orcin; Anti-GD3-7-al: Overlay-Färbung mit GD3-7-al-spezifischem Antikörper 10C6; PBMC Sp.1: enthält jeweils den Lipidextrakt von 1×10^7 PBMC des Spenders 1; PBMC Sp.2: enthält jeweils den Lipidextrakt von 1×10^7 PBMC des Spenders 2; GD3-7-al: enthält jeweils 5 μ g GD3-7-al-Standard.

Bei der Lipidextraktion wird die Gesamtheit der in der Probe enthaltenen GSL gewonnen. Bei beiden Spendern konnte GD3-7-al als schwache Bande detektiert werden. Damit konnte zunächst gezeigt werden, dass GD3-7-al in primären humanen Zellen vorkommt. Durch die Färbung mit dem mAb 10C6 und durch die Laufhöhe auf der Chromatographieplatte konnte die Substanz eindeutig als GD3-7-al identifiziert werden. Da der Antikörper 10C6 eine sehr hohe Sensitivität aufweist, ist die detektierte Menge GD3-7-al als sehr gering einzustufen. Als GD3-7-al-Standard wurde hier eine Rückstellprobe des Gemisches vor der HPLC verwendet.

3.5.5.1 Identifizierung der GD3-7-Aldehyd-haltigen Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie

Der Nachweis von GD3-7-al im Lipidextrakt von PBMCs zweier Spender führte zu der Frage, welche Zellen innerhalb der PBMCs dieses Gangliosid enthalten.

Da Zellen, die bestimmte Ganglioside synthetisieren, diese in der Regel auch auf ihrer Oberfläche zeigen und da für neue Therapieansätze sowie Detektionsmöglichkeiten Oberflächenmoleküle besonders interessant sind, wurde im nächsten Schritt die Oberfläche von PBMCs mittels Durchflusszytometrie am FACS-Calibur untersucht.

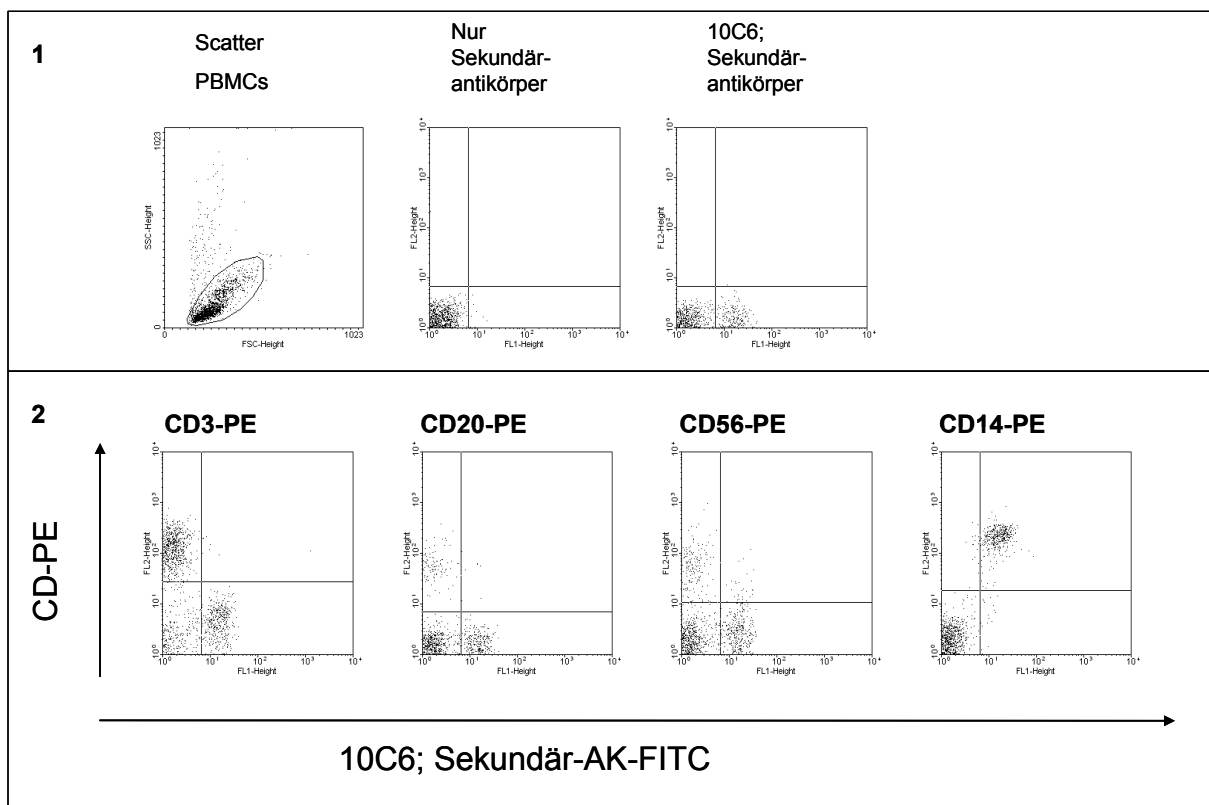


Abbildung 3.32: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an der Oberfläche peripherer mononukleärer Blutzellen am Beispiel eines positiven Spenders.

1: Scatterbild und Negativkontrollen der Färbung von PBMCs; 2: PBMCs wurden mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper sowie mit einem gegen den jeweiligen CD-Marker gerichteten Phycoerythrin-gekoppelten Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Zellen, die CD3 auf ihrer Oberfläche tragen, also in erster Linie T-Zellen, CD 20-positive Zellen, also B-Zellen sowie CD56-positive Zellen, also vor allem NK-Zellen, hatten kein mit 10C6 reagierendes Antigen, also auch kein GD3-7-al auf ihrer Oberfläche.

Die CD14-positiven Zellen hingegen, welche in erster Linie Monozyten sind, zeigten eine deutliche, durchflusszytometrisch messbare Oberflächenfärbung.

Die Färbung und flowzytometrische Untersuchung der PBMC weiterer 11 Spender mit dem Durchflusszytometer MACS-Quant ergab jedoch ein negatives Ergebnis bei allen Spendern

für alle Zellpopulationen. Die verwendete IgG2a-Isotypkontrolle führte ebenfalls zu einem negativen Resultat auf den Zellen der Spender.

Da bereits bei Anwendung der Lipidextraktion nur sehr schwache Banden zu detektieren waren, ist anzunehmen, dass die Menge der auf der Oberfläche der PBMC zu findenden Gangliosidmoleküle unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Bei der Lipidextraktion mit anschließender Färbung auf HPTLC wird hingegen die Gesamtheit der Ganglioside nachgewiesen, also auch die intrazellulär vorliegenden, welche bei der Durchflusszytometrie nach Oberflächenfärbung nicht detektierbar sind.

3.5.5.2 Untersuchung 6-Sulfo-LacNAc-dendritischer Zellen aus peripherem Blut auf das Vorkommen von GD3-7-Aldehyd

Da dendritische Zellen mit wesentlich niedrigerer Frequenz im peripheren Blut vorkommen als die bisher untersuchten Zellpopulationen, mussten für diese Zellen größere Probenvolumina gefärbt werden, bzw. die dendritischen Zellen isoliert werden.

6-Sulfo-LacNAc-dendritische Zellen (slan-DCs) stellen eine große Subpopulation der DCs im Blut dar und lassen sich mit einem in unserem Institut etablierten Antikörper (M-DC8) identifizieren und isolieren (Schäkel et al., 1998).

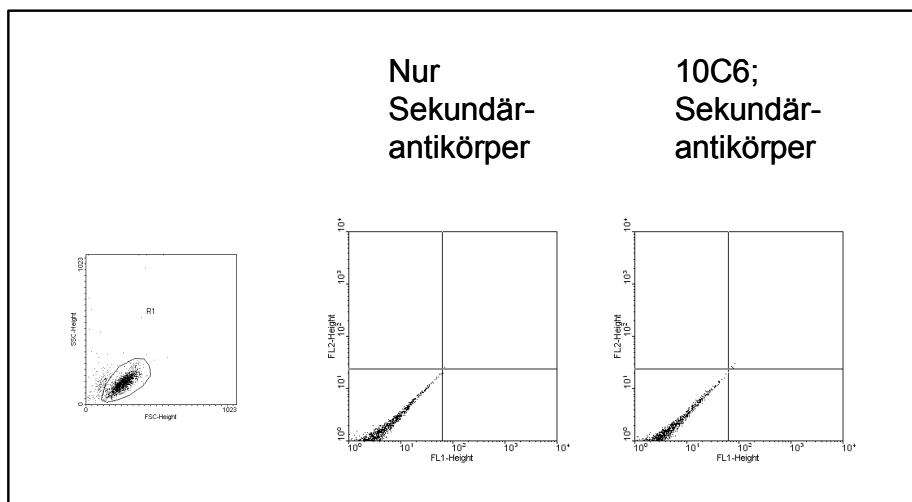


Abbildung 3.33: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an der Oberfläche von slan-DCs.

Aus Leukapheresat mit M-DC8-Antikörper und magnetischen Beads isolierte 6-Sulfo-LacNAc-dendritische Zellen wurden mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Sowohl bei der Färbung großer Volumina der Gesamtheit mononukleärer Zellen, als auch bei der Färbung isolierter slan-DCs ließ sich keine GD3-7-al-Ausprägung feststellen. Es wurde keine Zellpopulation gefunden, die sich mit 10C6 anfärben ließ (Abb. 3.33). Über mögliche intrazelluläre Vorkommen kann mit dieser Technik keine Aussage getroffen werden.

Mit dem Antikörper R24 konnte GD3 auf der Oberfläche eines Teils der slan-DCs in PBMCs nachgewiesen werden.

3.5.5.3 Untersuchung der von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDCs)

Von drei gesunden Spendern wurden mit Hilfe CD14-gekoppelter Beads und dem AutoMacs-Gerät mittels Positivselektion Monozyten isoliert und mit IL-4 und GM-CSF in Kultur genommen. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, aus Monozyten dendritische Zellen zu generieren. Diese zunächst immatures MoDCs wurden mit den gangliosidspezifischen Antikörpern gefärbt. Die Zellen zeigten eine leichte Ausprägung von GD3, jedoch nicht von 9-O-acGD3 oder GD3-7-al.

Das immature Stadium der Mo-DCs zeichnete sich durch eine zunächst noch geringe Ausprägung von CD83 und CD86 aus. Das Vorkommen von CD14 geht bei der Entwicklung von Monozyten zu Mo-DCs zurück (Bender et al., 1996).

Durch die Positivselektion über das CD14-Molekül fällt dieser Marker in der Färbung zum Startzeitpunkt direkt im Anschluss an die Isolation sehr niedrig aus.

Eine weitere Kultivierung der Zellen unter Supplementierung von GM-CSF, IL-4, IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE-2 führte zu deren Maturierung. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Marker CD83 und CD86 sowie eine Verminderung von CD14 (Bender et al., 1996). Abbildung 3.34 zeigt die Färbung dieser Marker auf den isolierten Monozyten und den daraus generierten MoDCs im direkten Vergleich am Beispiel eines repräsentativen Spenders.

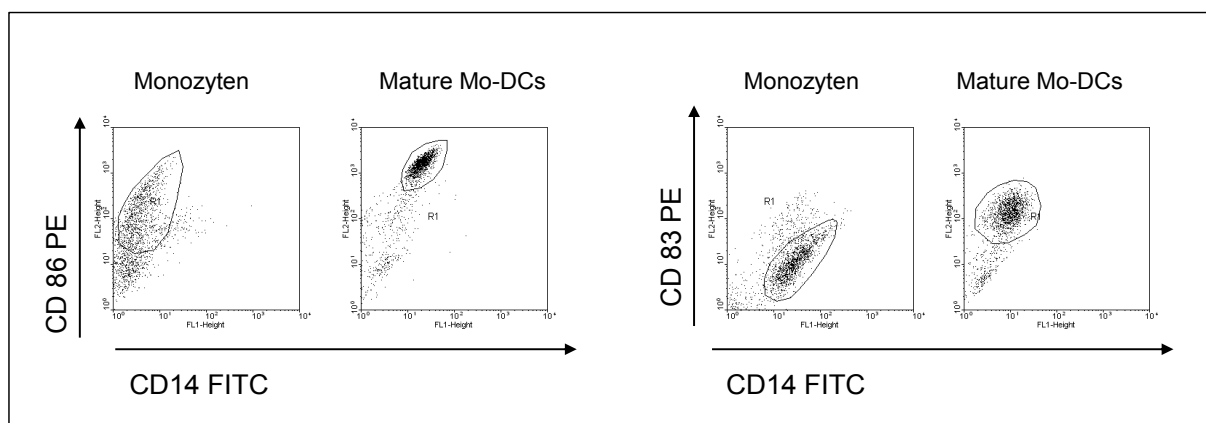


Abbildung 3.34: Durchflusszytometrische Messung der Marker CD14, CD83 und CD86 von Monozyten von Spender 3 im Vergleich zu den daraus gewonnenen matten Mo-DCs.

Monozyten und durch Zytokinstimulation gewonnene Mo-DCs wurden mit direktmarkierten Antikörpern gegen CD14, CD83 und CD86 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Die muren Mo-DCs zeigten weder 9-O-acGD3 noch GD3-7-al auf ihrer Oberfläche, da sich die Färbungen mit den Antikörpern M-T6004 und 10C6 als negativ erwiesen. Ein Teil der Zellen konnte jedoch mit dem Antikörper R24 angefärbt werden, was für das Vorkommen von GD3 spricht (Abb.3.35).

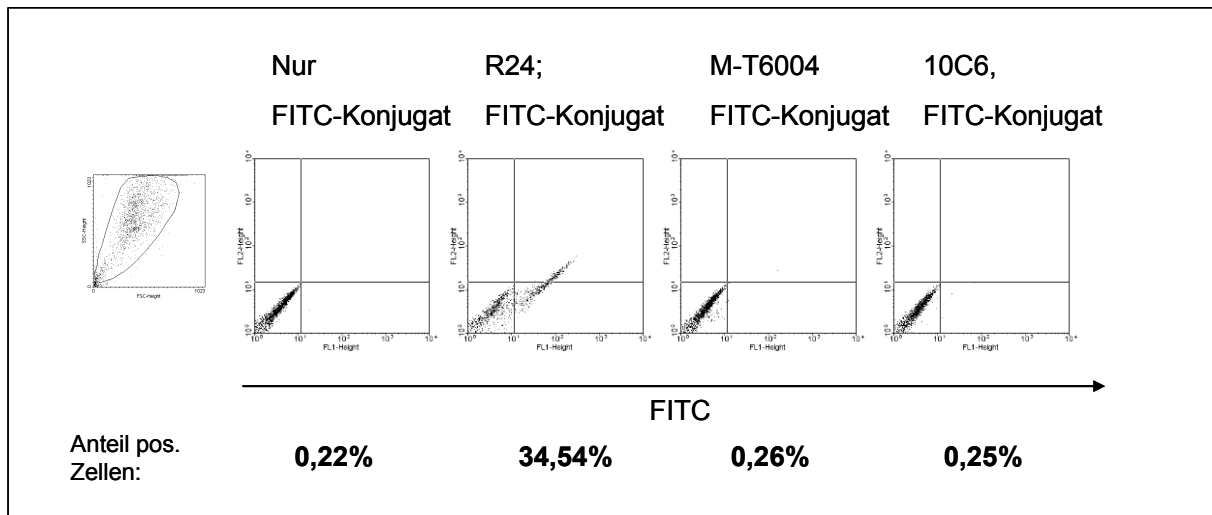


Abbildung 3.35: Durchflusszytometrische Messung der Ganglioside GD3, 9-O-acGD3 sowie GD3-7-al auf der Oberfläche von muren Mo-DCs von Spender 3.

Mo-DCs wurden mit den Antikörpern R24, M-T6004 sowie 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

3.5.5.4 Untersuchung von Granulozyten

Mit einer zweiphasigen Dichtegradientenzentrifugation wurden die Granulozyten aus peripherem Blut gewonnen und durchflusszytometrisch untersucht. Mit diesem Zellseparationsverfahren werden polymorphkernige Leukozyten mit einer Reinheit von 97 – 99% isoliert (English & Andersen, 1974).

Die so gewonnene Zellpopulation der Granulozyten erwies sich in allen Fällen als negativ für GD3-7-al (Abb. 3.36). Die Ganglioside GD3 und 9-O-acGD3 wurden ebenfalls nicht auf der Oberfläche nachgewiesen.

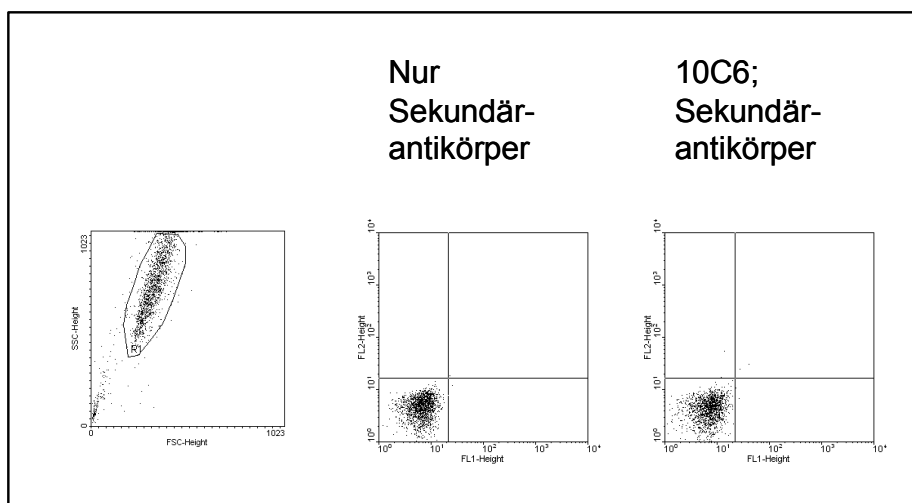


Abbildung 3.36: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an der Oberfläche von Granulozyten.

Isolierte Granulozyten wurden mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Dieses Ergebnis konnte durch die Färbung von Granulozyten auf kommerziellen Objektträgern für die indirekte Immunfluoreszenz bestätigt werden (Abb. 3.37). Hier kamen Granulozytenpräparationen zum Einsatz, wie sie für die Diagnostik von Autoimmunvaskulitiden verwendet werden. Die dabei erfolgte Fixierung mit Ethanol spielt dabei keine Rolle, da Ganglioside in Ethanol nicht löslich sind.

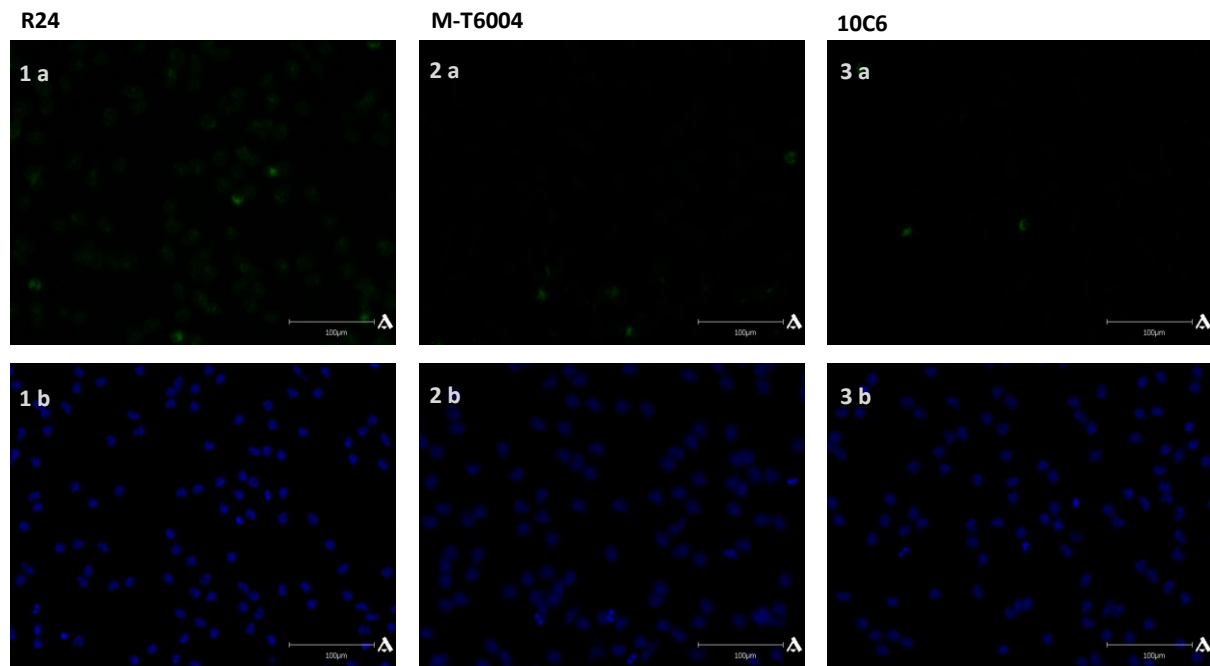


Abbildung 3.37: Negatives Ergebnis für die Bindung der Antikörper R24, M-T6004 und 10C6 bei der Indirekten Immunfluoreszenz an Granulozyten.

Ethanolfixierte Granulozyten auf Euroimmun-Objektträgern wurden mit dem jeweiligen Antikörper und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und am Aklides-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. 1: Färbung mit R24; 2: Färbung mit M-T6004; 3: Färbung mit 10C6; a: FITC-Aufnahme mit einer Belichtungszeit 500 ms; b: DAPI-Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 25 ms.

3.5.5.5 Vorkommen von GD3 und GD3-7-Aldehyd auf der Oberfläche von AML-Blasten

Ausgehend von der Tatsache, dass bei einigen Spendern das von 10C6 erkannte Antigen auf der Oberfläche der Monozyten gefunden wurde, lag es nahe, Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zu untersuchen.

Die Zellen wurden durch Leukapherese aus dem Blut der Patienten während einer akuten Blastenkrise gewonnen und unserem Institut durch die Klinik für Hämatologie / Onkologie des Universitätsklinikums der TU-Dresden zur Verfügung gestellt.

Zur Erhaltung der Zellen in der Kultur wurden diese in unseren Labors in einem Nährmedium mit dem Zusatz von GM-CSF, SCF und Interleukin-3 gehalten.

Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie wie beschrieben gefärbt.

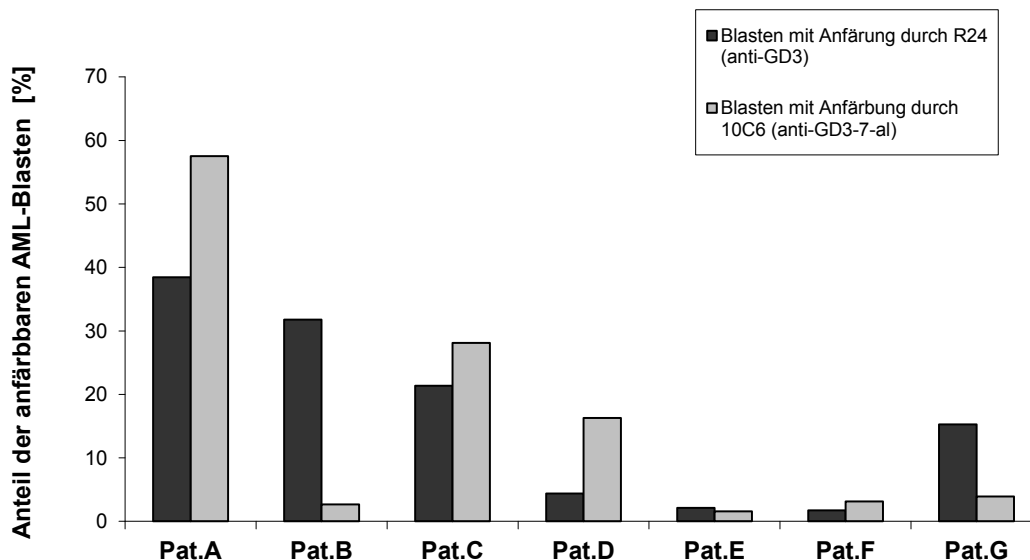


Abbildung 3.38: Anteil der mit R24 (anti-GD3) und 10C6 (anti-GD3-7-al) anfärbbaren AML-Blasten.

Der Anteil der positiven AML-Blasten im Leukapheresat von 7 Patienten wurde nach Oberflächenfärbung mit den Antikörpern R24 (anti-GD3) oder 10C6 (anti-GD3-7-al) mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Bei einem der Patienten ergab sich ein Prozentsatz von 58 % mit dem Antikörper 10C6 anfärbbarer Zellen. Zwei weitere Patienten hatten 28 % und 16 % Blasten mit von 10C6 erkannten Antigenen auf der Oberfläche. Die Zellen der anderen Patienten wiesen Werte von unter 5 % auf.

Für Patient F ist bekannt, dass es sich bei der Erkrankung wahrscheinlich um eine Mischform der akuten myeloischen Leukämie mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) handelte.

Leider lagen für keinen der Patienten Daten über die vorangegangene Medikation vor.

Ergänzend muss festgehalten werden, dass die Ausprägung des Antigens von 10C6 auf der Oberfläche der Blasten von Patient A zu einem späteren Messzeitpunkt wesentlich niedriger war. Die Blasten waren kryokonserviert, 6 Wochen später erneut in Kultur genommen und ein weiteres Mal gemessen worden. Nur noch 14 % der Zellen ließen sich dann mit 10C6 auf der Oberfläche anfärben. Der Anteil der mit R24 färbbaren Zellen veränderte sich dagegen nicht, hier wurden bei der späteren Messung 39 % ermittelt.

Die durchflusszytometrischen Daten geben einen Hinweis auf das mögliche Vorkommen der Glycolipide GD3 und GD3-7-al auf der Oberfläche von AML-Blasten. Da die Antikörper jedoch auch andere Moleküle mit entsprechender Glycanstruktur erkennen, kann dies nicht mit Sicherheit vertreten werden. Eine Lipidextraktion mit anschließender chromatografischer Auftrennung würde dies eindeutig belegen, war jedoch aufgrund des knappen Probenmaterials nicht möglich.

3.6 Untersuchung der Eignung von GD3-7-Aldehyd als mögliche Zielstruktur für eine immunologische Tumorthherapie

3.6.1 Auswirkung von Bestrahlung und Wasserstoffperoxidinkubation auf die Ausprägung des 10C6 - Antigens auf der Oberfläche von AML-Blasten

An den Blasten des Patienten C wurde *in vitro* untersucht, ob sich die Oberflächenausprägung der von 10C6 erkannten Strukturen durch die Behandlung der Zellen mit H_2O_2 bzw. mit radioaktiver Bestrahlung verändert. Dies war nur in geringem Ausmaß der Fall. Durch radioaktive Bestrahlung der Zellen kam es zu einem minimalen Anstieg und unter Einsatz von Wasserstoffperoxid zu einem Rückgang der mit 10C6 anfärbbaren Blasten (Abb. 3.39).

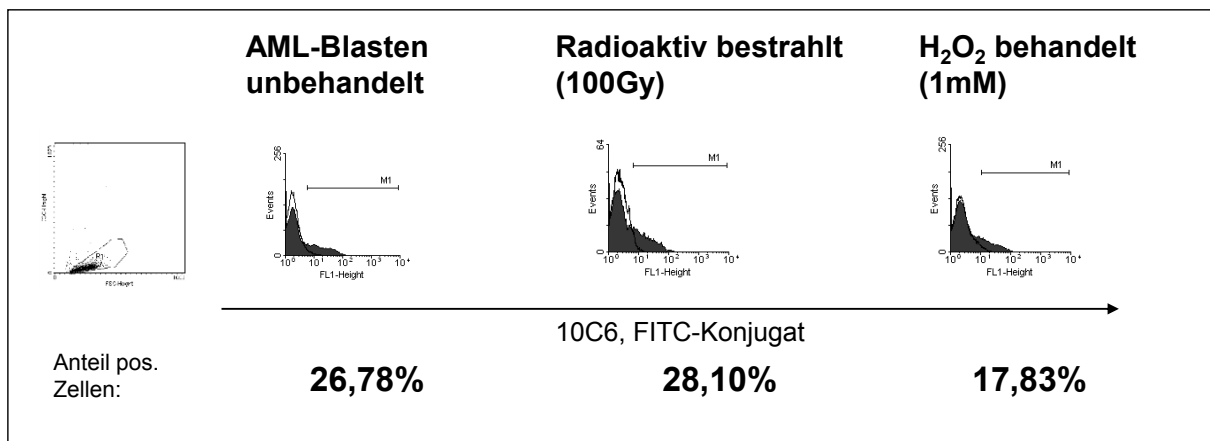


Abbildung 3.39: Anteil der mit 10C6 (anti-GD3-7-al) anfärbbaren AML-Blasten des Patienten C nach radioaktiver Bestrahlung der Zellen und nach Behandlung der Zellen. mit H_2O_2 .

AML-Blasten des Patienten C wurden radioaktiv bestrahlt oder mit H_2O_2 behandelt, mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Der schwarze Graph zeigt die nur mit dem Sekundärantikörper inkubierte Negativkontrolle, der grau ausgefüllte Peak repräsentiert die mit 10C6 gefärbten Zellen.

3.6.2 Oxidation des Gangliosides GD3 auf der Oberfläche von Melanomzellen

Das Disialogangliosid GD3 wird bereits als Zielstruktur in immunologischen Therapieversuchen genutzt. Ein entscheidender Nachteil ist dabei die relativ weite Verbreitung von GD3 in gesunden Geweben. Unerwünschte Nebenwirkungen einer solchen Therapie sind daher zu erwarten.

Mit diesem Experiment sollte ermittelt werden, ob es prinzipiell möglich ist, GD3 direkt auf der Oberfläche von Tumorzellen in GD3-7-al umzuwandeln. Somit würde die Möglichkeit geschaffen, durch eine lokale Vorbehandlung des Tumors eine antigene Zielstruktur für eine immunologische Tumorthherapie zu induzieren, die bisher in keinem gesunden adulten Gewebe gefunden wurde. Dies könnte die Nebenwirkungen entscheidend verringern.

Viele Melanome tragen das Disialogangliosid GD3 auf der Oberfläche. Beispiele für aus Melanomen generierte Zelllinien mit diesen Eigenschaften sind SK-Mel-23, Ma-Mel-11 und Ma-Mel-95. Da von diesen Zelllinien auch Lipidextrakte untersucht wurden und dabei zweifelsfrei GD3 nachgewiesen werden konnte, kann hier bei der Durchflusszytometrie auch vom Nachweis von GD3 bzw. seinen Derivaten ausgegangen werden. Die Zelllinie Pc3wt, eine Pankreaskarzinomlinie, zeigt keine mit R24 anfärbbare Struktur, also auch kein GD3 auf der Oberfläche und wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Zunächst wurde das Experiment an SK-Mel-23 mit verschiedenen Natriumperjodatkonzentrationen von 100 μM bis 10 mM durchgeführt. Die wirksame Konzentration konnte in den Bereich zwischen 200 μM und 500 μM eingeordnet werden. Bei einer Konzentration von 200 μM wurden 7 %, bei 500 μM bereits bis zu 96 % der Zellen mit dem Antikörper 10C6 angefärbt. Höhere Konzentrationen führten zu einer geringeren Viabilität der Zellen. Bei einer lokalen Behandlung würde dies zu Schäden am umliegenden, gesunden Gewebe führen. Für folgende Experimente mit weiteren Zelllinien wurde daher die Konzentration von 500 μM Natriumperjodat eingesetzt.

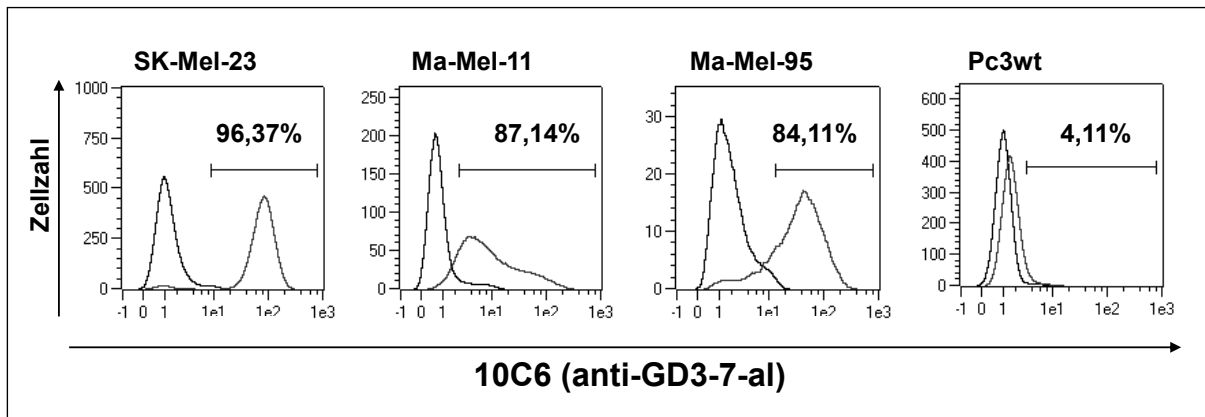


Abbildung 3.40: Färbung verschiedener Zelllinien mit dem Antikörper 10C6 ohne (schwarzer Graph) und mit Natriumperjodatbehandlung (grauer Graph).

Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M NaIO₄ behandelt, anschließend mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Der schwarze Graph in der Abbildung 3.40 repräsentiert die Färbung der Zellen mit dem Antikörper 10C6 ohne Behandlung mit Natriumperjodat. Der graue Graph zeigt die Färbung nach der beschriebenen Behandlung. Die Negativkontrollfärbung unter ausschließlicher Verwendung des PE-konjugierten Sekundärantikörpers lieferte erwartungsgemäß für alle Zelllinien ein negatives Ergebnis.

Alle drei GD3-haltigen Melanomzelllinien zeigten nach der Behandlung in hohem Maße GD3-7-al auf der Oberfläche. Die GD3-negative Zelllinie Pc3wt zeigte nach der Behandlung keine Anfärbung mit dem Antikörper 10C6.

3.6.3 Untersuchung der Ausprägung des 10C6-Antigens auf der Oberfläche von HEp-2-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies

Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob das Auftreten von GD3-7-al vom Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies abhängig ist.

Zur Induktion freier Sauerstoffradikale wurden HEp-2 mit UV-Licht bestrahlt. In Vorversuchen wurde die für HEp-2-Zellen tolerierbare Strahlendosis von 100 mJ/cm² ermittelt.

Die unbehandelten sowie die bestrahlten Zellen wurden im Anschluss mit dem Antikörper 10C6 für die Durchflusszytometrie gefärbt. Ein Teil der Zellen wurde fixiert und permeabilisiert, um eine Aussage über das intrazelluläre Vorkommen von GD3-7-al zu erhalten und ein Teil der Zellen wurde lebend auf ihrer Oberfläche gefärbt.

Um das Ausmaß des oxidativen Stresses zu bestimmen, wurden jeweils ein Teil der bestrahlten und ein Teil der unbehandelten Zellen mit DCFDA gefärbt. Diese Substanz kann

durch ROS oxidiert werden und weist in seiner oxidierten Form eine grüne Fluoreszenz auf. Die Stärke der Fluoreszenz korreliert mit dem Auftreten von ROS und kann durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Die Messung des Anteils apoptotischer Zellen erfolgte mittels SubG1-Analyse.

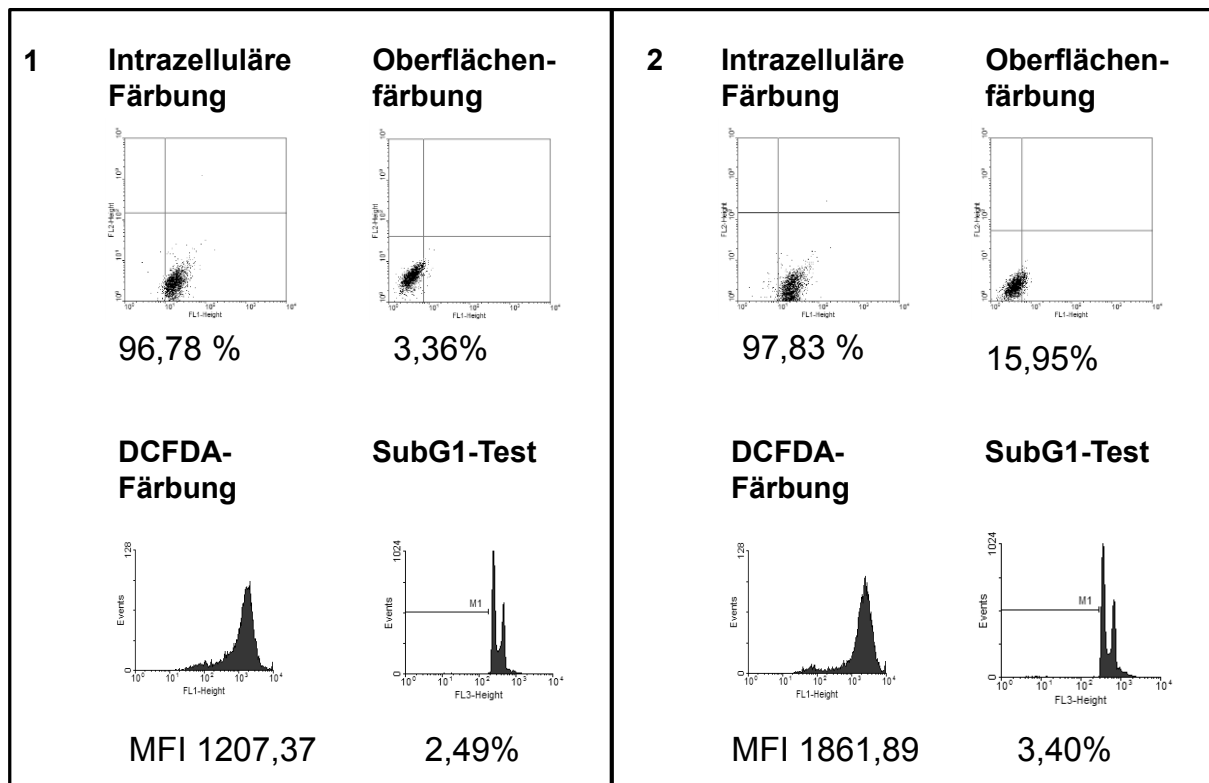


Abbildung 3.41: Durchflusszytometrische Untersuchung der Ausprägung von GD3-7-al auf der Zelloberfläche von Hep-2-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies und der Apoptoserate.

Hep-2-Zellen wurden vor (1) und nach (2) der Bestrahlung mit 100 mJ/cm^2 UV-Licht jeweils intrazellulär und auf der Oberfläche mit dem mAb 10C6 gefärbt. Das Auftreten von ROS wurde mit der DCFDA-Färbung detektiert und die Apoptoserate mit der SubG1-Färbung ermittelt.

Mit dem Anstieg des mittleren Fluoreszenzindex der DCFDA-Färbung von 1207,37 (Abb. 3.41(1)) auf 1861,89 (Abb. 3.18(2)) konnte gezeigt werden, dass die UV-Bestrahlung zu einem intrazellulären Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies führt.

Die SubG1-Analyse weist nur einen sehr geringen Anstieg der Apoptoserate von 2,49 % auf 3,40 % aus. Dies zeigt, dass die HEp-2-Zellen diesen ROS-Anstieg tolerieren können.

Sowohl in den UV-bestrahlten, als auch in den unbehandelten HEp-2-Zellen konnte intrazellulär eine mit dem Antikörper 10C6 anfärbbare Struktur nachgewiesen werden. Nahezu alle Zellen beider Gruppen waren positiv.

Der Anteil der Zellen, welche diese Struktur auf der Oberfläche tragen, erhöhte sich nach der Bestrahlung von 3,36 % auf 15,95 %.

Um sicherzustellen, dass es sich bei der mit der Durchflusszytometrie detektierten Substanz um GD3-7-al handelt, wurde von der Zelllinie HEp-2 ein Lipidextrakt hergestellt, auf HPTLC-Platten chromatographiert und immunchemisch gefärbt.

Um die Zuordnung der Banden zu erleichtern, wurde darüber hinaus eine Platte mit Orcin gefärbt.

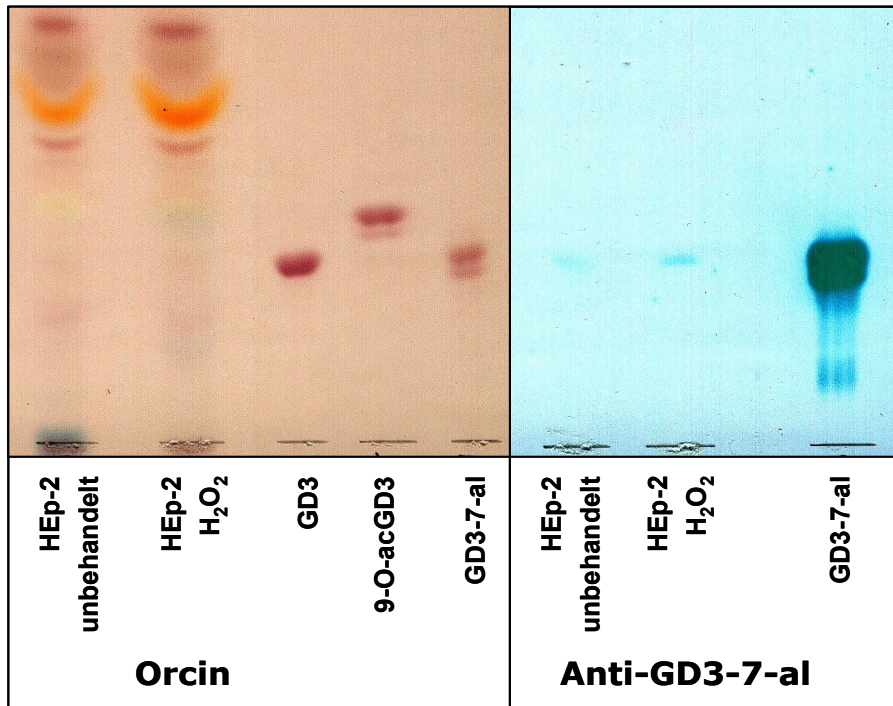


Abbildung 3.42: Untersuchung des Lipidextraktes von HEp-2-Zellen auf HPTLC in Overlaytechnik.

Orcin: Färbung mit Orcin; Anti-GD3-7-al: Overlay-Färbung mit GD3-7-al-spezifischem Antikörper 10C6; HEp-2 unbehandelt: enthält jeweils den Lipidextrakt von 1×10^7 HEp-2-Zellen; HEp-2 H₂O₂: enthält jeweils den Lipidextrakt von 1×10^7 HEp-2-Zellen nach Behandlung mit 10 mM H₂O₂; GD3: enthält 5 µg GD3-Standard; 9-O-acGD3: enthält 5 µg 9-O-acGD3-Standard; GD3-7-al: enthält jeweils 5 µg GD3-7-al

Neben der unbehandelten Zellprobe wurde auch eine Zellprobe untersucht, die zuvor reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt wurde. Da für die Lipidextraktion eine große Zellzahl von mindestens 1×10^7 Zellen erforderlich ist und die Kapazität des UV-Bestrahlungsgerätes begrenzt ist, wurde hier anstelle der Bestrahlung die Inkubation mit wasserstoffperoxidhaltigem Medium zur Induktion von oxidativem Stress eingesetzt.

Die Menge der in beiden Zellextraktproben enthaltenen Ganglioside ist gering, daher ließ sich in der Orcinfärbung mit relativ niedriger Sensitivität kaum etwas detektieren, mit der immunchemischen Färbung mit dem sensitiven Antikörper 10C6 konnte in beiden HEp-2-Extrakten eine Bande angefärbt werden.

Da die mit 10C6 gefärbte Substanz die gleiche chromatographische Laufhöhe wie der GD3-7-al Standard aufweist, konnte die Substanz im Lipidextrakt der HEP-2-Zellen als GD3-7-al identifiziert werden.

Die mit Wasserstoffperoxid behandelte Zellprobe enthält eine größere Menge GD3-7-al, da die Bande deutlicher hervortritt als in der unbehandelten Zellprobe.

3.6.4 Untersuchung der Ausprägung von GD3-7-Aldehyd auf der Oberfläche von SK-Mel-23-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies

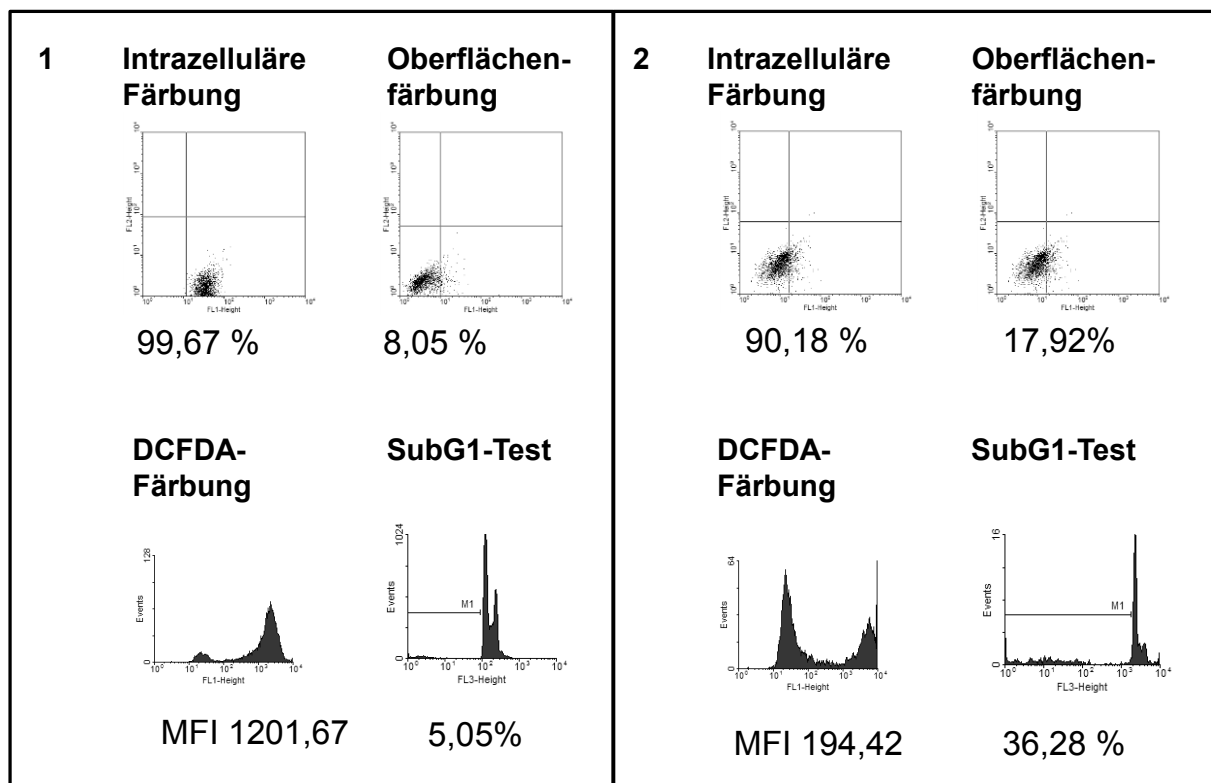


Abbildung 3.43: Durchflusszytometrische Untersuchung der Ausprägung von GD3-7-al auf der Zelloberfläche von SK-Mel-23-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies und der Apoptoserate.

SK-Mel-23-Zellen wurden vor (1) und nach (2) der Bestrahlung mit 80 mJ/cm² UV-Licht jeweils intrazellulär und auf der Oberfläche mit dem mAb 10C6 gefärbt. Das Auftreten von ROS wurde mit der DCFDA-Färbung detektiert und die Apoptoserate mit der SubG1-Färbung ermittelt.

Das gleiche Vorgehen wie für HEP-2-Zellen wurde auch für die Melanomzelllinie SK-Mel-23 gewählt (Abb. 3.43). Diese Zelllinie erwies sich in Vorversuchen als weniger resistent gegenüber UV-Bestrahlung, daher wurde hier die niedrigere Strahlendosis von 80 mJ/cm²

gewählt. Dennoch kam es im Versuch zu einer Erhöhung der Apoptoserate von ca. 5 % auf 36 %.

Durch diesen hohen Anteil apoptotischer Zellen ergibt sich in der Messung der DCFDA-Färbung ein Doppelpeak, der im Mittel einen sehr niedrigen MFI aufweist. Dabei repräsentieren die apoptotische Zellen den Peak mit der niedrigen Fluoreszenzintensität, weil aus diesen Zellen aufgrund ihrer bereits permeabilisierten Zellmembran ein Teil des Farbstoffes DCFDA austritt. Der Peak mit dem höheren MFI repräsentiert die vitalen Zellen, in denen oxidativer Stress induziert wurde.

Auch SK-Mel-23-Zellen weisen nach Induktion reaktiver Sauerstoffspezies einen höheren Anteil an auf der Oberfläche GD3-7-al-positiven Zellen auf. Dieser steigt von initial 8 % auf ca. 18 % wie der Gegenüberstellung in Abbildung 3.43 zu entnehmen ist.

3.6.5 Nachweis der Einlagerung von GD3-7-Aldehyd in die Zellmembran von HL60-Zellen

Die Einlagerung des Gangliosids GD3-7-al in die Oberfläche von HL60-Zellen wurde bereits für die Überprüfung der Verwendbarkeit des Antikörpers für die Durchflusszytometrie gezeigt. Diese Einlagerung konnte auch mit der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. In Abbildung 3.44 ist eine Färbung der Plasmamembran der GD3-7-al-behandelten HL60-Zellen mit dem Antikörper 10C6 zu sehen (1a), die in unbehandelten gefärbten HL60-Zellen nicht auftritt (1b).

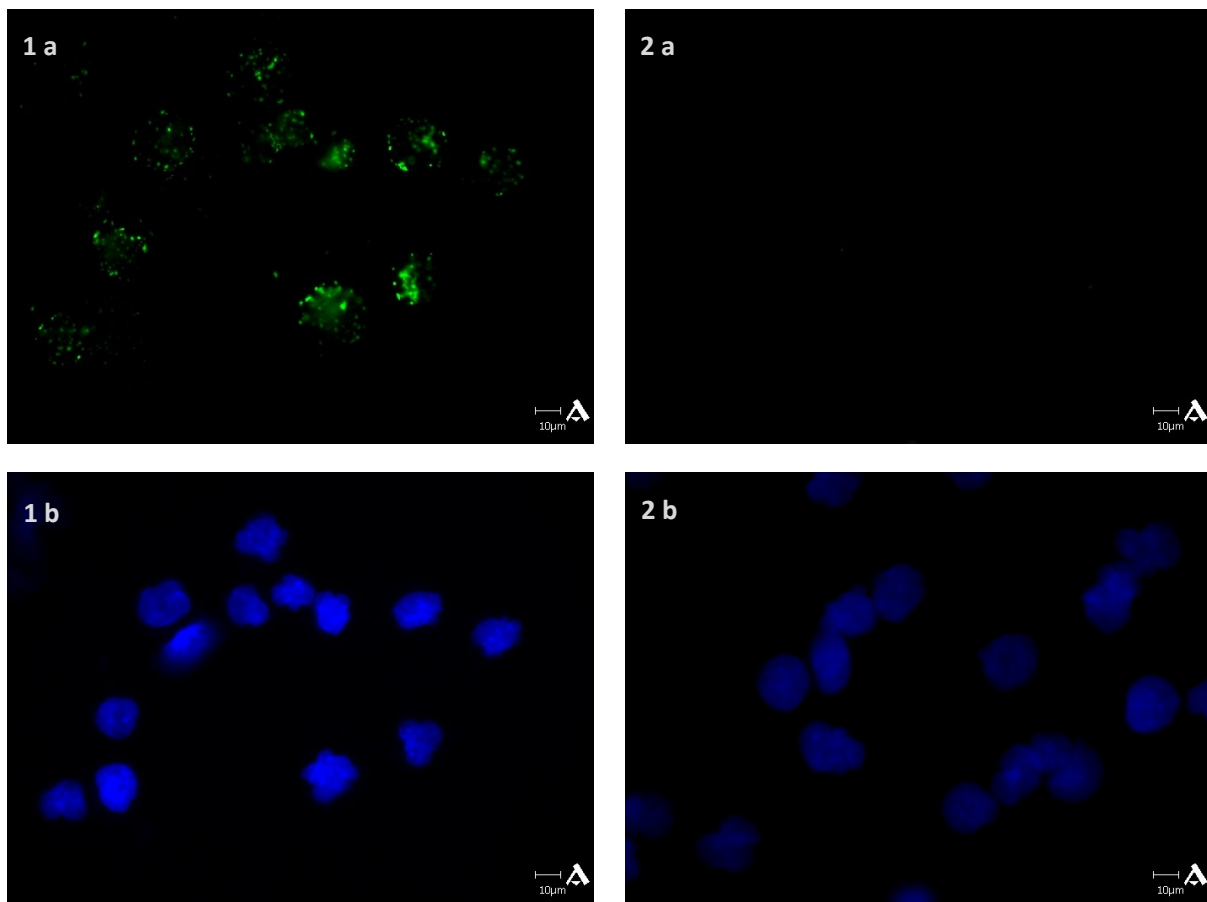


Abbildung 3.44: Indirekte Immunfluoreszenz der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen.

1: HL60-Zellen wurden 72 h lang mit 1ml RPMI Medium mit 10 µg GD3-7-al inkubiert, mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt, mit Cytospin auf Objektträger zentrifugiert und am Aklides-Fluoreszenzmikroskop mit 40-fach Objektiv aufgenommen. a: FITC-Aufnahme mit einer Belichtungszeit 150 ms; b: DAPI-Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 25 ms; 2: Kontrollzellen ohne GD3-7-al-Inkubation in gleicher Weise gefärbt und aufgenommen.

3.6.5.1 Nachweis des integrierten GD3-7-Aldehyd in Abhängigkeit von der Zeit

Um zu ermitteln, wie lange GD3-7-al auf der Oberfläche von Zellen stabil bleibt, wurde der Versuch, der bereits für den Nachweis der Eignung des Antikörpers 10C6 für die Durchflusszytometrie eingesetzt wurde, abgewandelt.

Zunächst wurden die Zellen in GD3-7-al-haltigem Medium inkubiert und bis zum Messzeitpunkt in diesem Medium belassen.

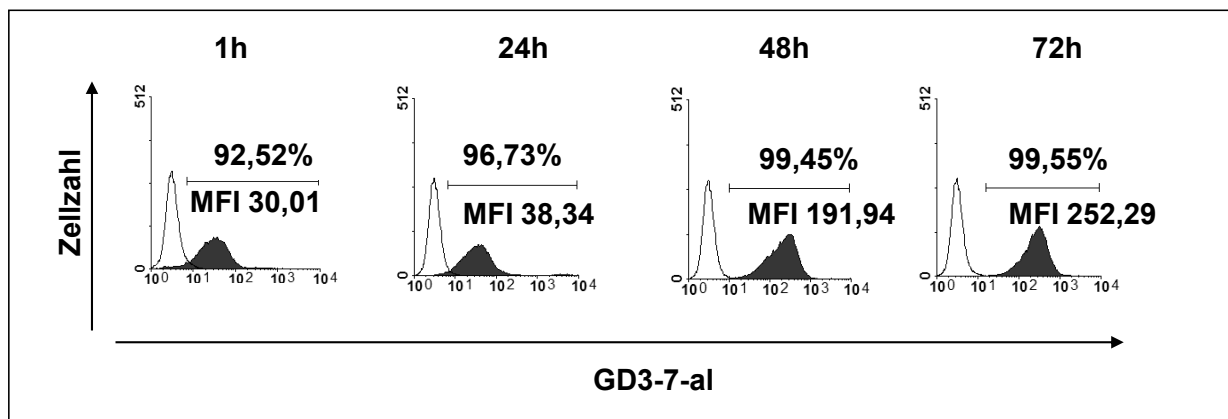


Abbildung 3.45: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen im Verlauf von 72 h bei Verbleib in GD3-7-al-haltigem Medium.

HL60-Zellen wurden mit RPMI mit 10 µg/ml GD3-7-al bei 37 °C inkubiert, zu den jeweiligen Zeitpunkten geerntet, mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Der schwarze Graph zeigt die nur mit dem Sekundärantikörper inkubierte Negativkontrolle, der grau ausgefüllte Peak repräsentiert die mit 10C6 gefärbten Zellen.

Wie der Abbildung 3.45 zu entnehmen ist, nahm der MFI unter diesen Bedingungen im zeitlichen Verlauf noch zu. Dies ist ein Zeichen dafür, dass noch ausreichend Moleküle im Medium vorhanden waren und keine oder nur eine sehr geringe Degradierung im Medium stattfand. Nach 48 h trugen nahezu alle Zellen GD3-7-al auf der Oberfläche. Die Apoptoserate veränderte sich nicht, die Werte blieben konstant unter 20 %.

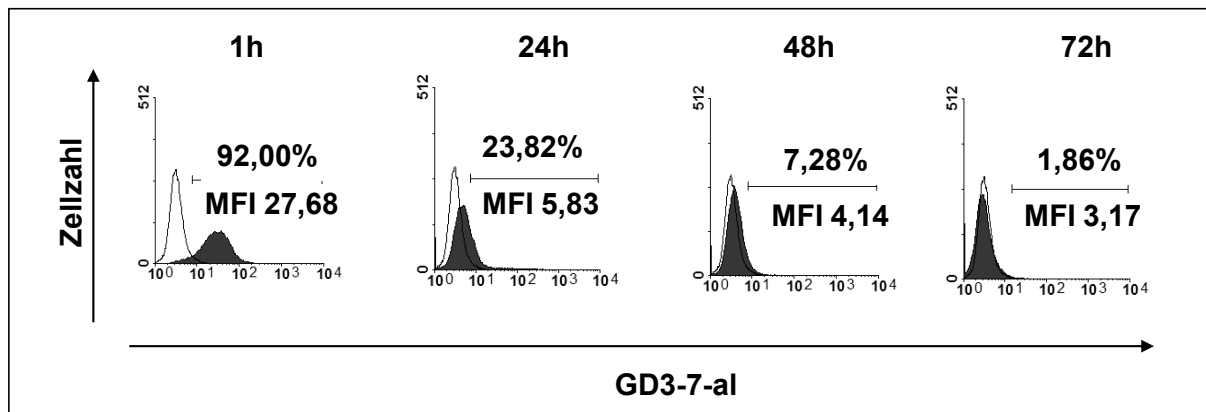


Abbildung 3.46: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen im Verlauf von 72 h in Medium ohne GD3-7-al.

HL60-Zellen wurden 1 h bei 37 °C mit RPMI mit 10 µg/ml GD3-7-al inkubiert, anschließend abzentrifugiert und mit frischem Medium gewaschen, in Medium ohne GD3-7-al eingesät. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, mit dem Antikörper 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Der schwarze Graph zeigt die nur mit dem Sekundärantikörper inkubierte Negativkontrolle, der grau ausgefüllte Peak repräsentiert die mit 10C6 gefärbten Zellen.

Um den Verlauf der Degradierung oder Internalisierung des in die Oberfläche eingelagerten GD3-7-al zu verfolgen, wurden die Zellen in gleicher Weise mit GD3-7-al-haltigem Medium inkubiert, nach 1 h mit frischem Standardmedium gewaschen, in frischem Standardmedium weiter inkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten durchflusszytometrisch untersucht.

Aus Abbildung 3.46 geht hervor, dass der Gehalt an GD3-7-al auf der Oberfläche der Zellen mit der Zeit abfiel und nach 72 h das Ausgangsniveau erreichte.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung von GD3-7-Aldehyd – der Weg vom Apoptosemediator zum Tumortarget

Während sich Nukleinsäuren und Proteine einer hohen wissenschaftlichen Aufmerksamkeit erfreuen, ist über die Funktion anderer natürlicher Makromoleküle wie Kohlenhydrate und Lipide relativ wenig bekannt.

Dabei sind diese beiden Gruppen durchaus nicht nur Energieträger und strukturgebende Materialien. Kohlenhydrate und Glycokonjugate stellen in der Natur aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt durchaus auch Träger von Informationen dar. Die enorme Strukturvielfalt ist theoretisch unendlich, wird jedoch von der Enzymausstattung des jeweiligen Organismus begrenzt. Der Ausfall eines einzigen Enzyms kann fatale Konsequenzen für den Organismus haben (Lindhorst, 2010).

Kohlenhydrate spielen eine Rolle als Oberflächenmoleküle auf Zellen und nehmen so an der Signalübermittlung zwischen den Zellen teil, sie können Eintrittspforten für Pathogene sein, aber auch für deren Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem sorgen. Glycokonjugate können intrazelluläre Signale übermitteln.

Bei diesen komplexen Vorgängen spielen die Strukturen der beteiligten Moleküle eine entscheidende Rolle. Die geringe Veränderung weniger funktioneller Gruppen kann ihre Funktion komplett verändern.

Voraussetzung für weiterführende Forschung auf diesem Gebiet ist die Entwicklung und Verbesserung von Methoden zur Gewinnung modifizierter Glycokonjugate sowie zu deren Nachweis.

4.2 Darstellung der Glycolipidantigene GD3, 9-O-acetyl-GD3 und GD3-7-Aldehyd

In den Anfängen der Untersuchung von GD3 und seinen Derivaten wurde nach entsprechenden Gangliosidquellen gesucht.

Ren et al. fanden hohe Gehalte an O-acetylierten Gangliosiden in boviner Buttermilch (Ren et al., 1992). Da Kuhmilch und die daraus hergestellten Produkte darüber hinaus reich an GD3 sind, wurde auf Buttermilchpulver als kostengünstige Gangliosidquelle zurückgegriffen.

Glycosphingolipide sind entscheidende Bestandteile der Membranen der Milchfettnicellen. 90 % der Glycosphingolipide der Milch befinden sich in diesen Membranen (Keenan, 1974).

Nach Takamizawa sind 315,10 nmol an GD3 gebundene Sialinsäure in einem Gramm Buttermilchpulver enthalten (Takamizawa et al., 1986). Daraus ergibt sich für das Disialogangliosid GD3 mit einem Molekulargewicht von 1472,78 g/mol eine mögliche maximale Ausbeute von 232 mg GD3 je kg Buttermilchpulver.

Da in dieser Arbeit besonderer Wert auf die Reinheit des verwendeten Materials gelegt wurde, waren Verluste im Rahmen der Reinigungsschritte in Kauf zu nehmen.

Nach der Reinigung des Rohextraktes aus 650 g Buttermilchpulver an der Kieselgelchromatographiesäule wurde nur die sphingomyelinfreie Fraktion CM 85/15 für weitere Reinigungsschritte eingesetzt. Diese repräsentierte etwa die Hälfte des gesamten extrahierten GD3. Bei der DEAE-Ionenaustauschchromatographie wurde etwa ein Viertel des eingesetzten Materials abgetrennt. Die Sammelfraktion 108 - 116 nach der HPLC enthielt etwa drei Viertel des in der HPLC eingesetzten GD3.

Daraus ergibt sich rechnerisch die mögliche Ausbeute von ca. 42 mg.

Mit Hilfe der densitometrischen Quantifizierung wurde eine reale Ausbeute von ca. 36 mg ermittelt.

Für diese Methode der Quantifizierung muss ein Toleranzbereich von etwa 10 % eingeräumt werden. Diese Diskrepanz resultiert zum einen aus der manuellen Festlegung der Grenzen der Absorptionspeaks am Shimadzu-Scanner, zum anderen aus den verwendeten Standards und deren Konzentration.

Die Standards sind, wie auch die selbst hergestellten Gangliosidproben, in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol gelöst. Durch häufigen Gebrauch entweicht ein Teil des Lösungsmittels und der Standard wird aufkonzentriert. Erfolgt nun der Vergleich der Absorptionen der Banden der Probe mit denen des aufkonzentrierten Standards, wird für die Probe ein tendenziell zu niedriger Wert ermittelt.

Darüber hinaus unterliegt der Gangliosidgehalt der Milch natürlich großen Schwankungen (Mc Jarrow et al., 2009).

Für die Reinigung und Quantifizierung des 9-O-acetylierten Derivates von GD3 gilt dies alles gleichermaßen.

Ren et al. isolierten aus 1,7 kg Buttermilchpulver 37 mg 7-O- oder 9-O-acetyliertes Gangliosid GD3 (Ren et al., 1992).

Für die vorliegende Arbeit wurden die 9-O-acGD3-haltigen Teilfraktionen aus drei früheren Buttermilchextraktionen verwendet. Dies entspricht einer Menge von etwa 1,5 - 2 kg Ausgangsmaterial. Da für die Gewinnung von 9-O-acGD3 Material verwendet wurde, dem zum Teil bereits 7-O-acetyl-GD3 entzogen wurde, muss hier von einer niedrigeren Ausbeute ausgegangen werden.

In der Summe der beiden Sammelfractionen A und B wurde eine Ausbeute von 20,15 mg 9-O-acGD3 erzielt.

Für die Herstellung von GD3-7-al wurden 19 mg GD3 eingesetzt.

Die Reaktion von Natriumperjodat an der glycerinartigen Seitenkette der Sialinsäure wird als äußerst selektive und sehr milde Oxidation beschrieben (Murray et al., 1989).

Im Gegensatz zu anderen Oxidationsmitteln führt Natriumperjodat nicht zu einer Aufspaltung der Glycosid- und der Halbacetalbindungen. Es entstehen also keine niederen, wasserlöslichen Aldehyde, sondern die Kohlenhydratgrundstruktur bleibt erhalten. Des Weiteren findet bei der Oxidation mit Perjodat keine Weiteroxidation der Aldehyde zu Fettsäuren statt (Heckner & Strufe, 1956).

Nach der Oxidation des reinen GD3 zur Gewinnung von GD3-7-al wurden jedoch geringe Mengen polarer und unpolarer Nebenprodukte gefunden.

Unpolare Nebenprodukte könnten entstehen, wenn Teile der Kohlenhydratkette stärker abgebaut werden. Polare Nebenprodukte deuten auf Degradierungen der Fettsäure oder des Sphingosins hin. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kondensation der Aldehydgruppe mit primären Aminen. Die so entstandenen Produkte würden entsprechend ihrer Polarität auf der HPTLC-Platte auch abweichend von GD3 migrieren.

Bei der erstmaligen Reinigung von GD3-7-al mit der HPLC zum Abschluss der Gewinnung von GD3-7-al wurden drei Sammelproben generiert. Diese ergaben in der Summe 16 mg gereinigtes GD3-7-al. Es wurden also ca. 84 % des Ausgangsmaterials umgesetzt und konnten nach der Reinigung mit der HPLC wiedergefunden werden.

Bei der Herstellung von GD3-7-al mit ROS tauchte das Phänomen der Bildung von Nebenprodukten ebenfalls auf.

In Vorversuchen unter Zusatz der Lösungen ohne Kühlung während der Ultraschallbehandlung und ohne konsequentem Lichtabschluss wurden bei der Verwendung

höherer Reagenzienkonzentrationen zusätzliche Banden ober- und unterhalb der Laufhöhe von GD3-7-al detektiert. Dies legt nahe, dass unter härteren Oxidationsbedingungen auch die Fettsäure, die Sphingosinstruktur oder der Kohlenhydratanteil modifiziert werden, was in einer veränderten Polarität des Moleküls und damit auch einer veränderten Migration bei der Chromatographie resultiert.

4.3 GD3-7-Aldehyd als Effektormolekül der mitochondrial vermittelten Apoptose

In den Arbeiten zahlreicher Arbeitsgruppen ist gezeigt worden, dass GD3 am mitochondrialen Weg der Apoptose beteiligt ist. An der Aufklärung des genauen Mechanismus wird dabei nach wie vor gearbeitet.

Bereits 1997 stellten de Maria und seine Kollegen fest, dass es nach der Kreuzvernetzung von CD95-Molekülen (Apo-1 oder FAS) auf der Oberfläche von lymphoiden und myeloiden Tumorzelllinien, zu einer intrazellulären Synthese und vorübergehenden Anreicherung des Gangliosides GD3 kommt.

In ihren Experimenten kam es nach transienter Überexpression der GD3-Synthase in HUT78-Zellen innerhalb von 24 Stunden zur Apoptose der transfizierten Zellen. Kontrollzellen, in denen eine GD3-Synthase mit Defekt in der katalytischen Domäne überexprimiert wurde, zeigten diese Reaktion nicht (de Maria et al., 1997).

GD3 konnte im Verlauf der Apoptose kolokalisiert mit den Mitochondrien elektronenmikroskopisch visualisiert werden (Rippo et al., 2000).

Die Gruppe um Carmen Garcia Ruiz untersuchte die Bedeutung von GD3 im Ablauf des mitochondrialen Apoptosepfades an isolierten Rattenlebermitochondrien. Werden diese mit GD3 behandelt, kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer massiven Wasserstoffperoxidproduktion, gefolgt von einem Verlust des transmembranalen Potentials und anschließender Freisetzung der intramitochondrialen Faktoren. Versuche an Hepatozyten zeigten, dass diese dadurch apoptotisch werden. Da Glutathion - depletierte Zellen wesentlich sensitiver auf eine Behandlung mit GD3 reagierten, schlussfolgerten die Forscher, dass die mitochondrial vermittelte Apoptose vom oxidativen Stress abhängig sei (Garcia-Ruiz et al., 2000).

Auch Colell et al. stellten fest, dass der proapoptotische Effekt von GD3 offenbar vom Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies in der Umgebung des Mitochondriums abhängig ist. Die proapoptotische Wirkung von GD3 kann durch Antioxidantien unterbunden werden (Colell et al., 2004).

Für BJAB-Zellen konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress durch extrazellulär vorkommendes H_2O_2 oder durch hohe Aktivität der Glucoseoxidase entstehendes H_2O_2 über eine Fenton-Reaktion mit intrazellulär vorkommendem Eisen zu einem intrazellulären Anstieg von OH-Radikalen führt. Diese ROS führen zur Apoptose der Zellen (Lee et al., 2006).

In der Folgezeit wurde nach der Zielstruktur gesucht, an welcher GD3 am Mitochondrium angreifen könnte. Dabei wurde der Permeabilisierungs-Transitions-Poren-Komplex (PTPC) näher betrachtet. In einem Modell von Garrido et al. wird er als eine Einheit aus VDAC (*Voltage dependent anion channel*), ANT (*Adenin nucleotid translocase*) und Cyp D (*Cyclophilin D*) dargestellt. Dieser Proteinkomplex durchzieht die äußere und die innere Mitochondrienmembran und stellt so eine Verbindung zwischen Mitochondrienmatrix und Zytosol her (Garrido et al., 2006).

Dieser Porenkomplex kann durch Faktoren wie zum Beispiel Ca^{2+} oder ROS geöffnet werden. Dies ermöglicht den Einstrom von Ionen, vor allem K^+ , in den Matrixbereich bis zur Erreichung des Gleichgewichtes mit der Umgebung. Die Ladungsverschiebung führt zum Zusammenbruch des transmembranalen Potentials der Mitochondrien und zur Entkopplung der Atmungskette (Halestrap, 2010).

Der nachfolgende osmotisch bedingte Einstrom von Wasser führt zunächst zum Anschwellen der Mitochondrienmatrix. Die innere Mitochondrienmembran kann dem erhöhten Volumen durch seine Faltung nachgeben, die äußere Mitochondrienmembran hingegen reißt infolge des Drucks von innen und setzt Faktoren aus dem Intermembranbereich ins Zytoplasma frei. Die wichtigsten dieser ebenfalls proapoptotischen Komponenten sind Cytochrom C, Apoptoseinduzierender Faktor (AIF), ROS sowie Procaspasen, welche im Zytoplasma aktiviert werden (Garrido et al., 2006).

In Zusammenarbeit mit Brenner et al. konnte gezeigt werden, dass das oxidierte Derivat von GD3 mit der Komponente ANT des PTPC interagiert. Im Gegensatz zu GD3 und seinem 9-O-acetylierten Derivat führt GD3-7-al zur Formation von Poren in ANT-haltigen Proteoliposomen. Auf ANT-freie Kontrollliposomen hat das Gangliosid keinen Einfluss. Höhere Konzentrationen ADP und ATP hemmen diesen Effekt (Brenner et al., 2009).

Darüber hinaus ist bereits seit längerem bekannt, dass sich einige Tumorzellarten durch die Acetylierung des Gangliosids GD3 der mitochondrial vermittelten Apoptose entziehen (Malisan et al., 2002; Kniep et al., 2006). Dieses Derivat kann an der terminalen Sialinsäure nicht oxidiert werden (Blum & Barnstable, 1987).

Diese Informationen legen nahe, dass es sich beim eigentlichen Effektormolekül der mitochondrial vermittelten Apoptose um die oxidierte Variante des Disialogangliosids GD3 handeln könnte.

Wenn GD3-7-al das Effektormolekül der GD3-induzierten Apoptose wäre, sollte es möglich sein, in 9-O-acGD3-produzierenden Zellen durch die Inkubation mit GD3-7-al diese Resistenz zu durchbrechen. Daher wurde die Zelllinie Molt-4 mit den unterschiedlichen GD3-Derivaten inkubiert und die daraus resultierende Apoptoserate untersucht.

Molt-4-Zellen sind Zellen einer akuten T-lymphoblastischen Leukämie und besitzen die Fähigkeit, GD3 in sein 9-O-acetyliertes Derivat zu überführen. Sie können sich auf diese Weise einer Apoptoseinduktion durch GD3 entziehen und sind daher GD3-resistent. Diese Eigenschaft ist auch für einige Melanom- und Neuroblastomzelllinien beschrieben (Malisan et al., 2002). Um dies zu zeigen, wurde die verwendete Zelllinie zunächst auf das Vorhandensein der Ganglioside hin überprüft. Da intrazellulär vorkommende Ganglioside auch in die Plasmamembran eingelagert werden (Bartke & Hannun, 2009), können diese auch auf der Oberfläche mit entsprechenden Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch gemessen werden.

Wie aus diesen Messungen klar wird, produziert die Zelllinie große Mengen GD3 und trägt dieses Gangliosid auch auf der Zelloberfläche. In geringer Menge wurde auch 9-O-acGD3 nachgewiesen, was die Fähigkeit der Molt-4-Zellen zur Acetylierung von GD3 verdeutlicht.

Neben dieser für das Experiment notwendigen Eigenschaft hat Molt-4 den Vorteil, in Suspensionskultur zu wachsen und nicht an Kulturgefäßen zu adhären. Eine Beeinflussung der gemessenen Apoptoserate durch aggressive Reagenzien zum Ablösen adhärenter Zellen ist somit ausgeschlossen.

Bereits nach 24 Stunden Inkubation mit den drei Varianten von GD3 zeigte sich deutlich, dass es in den GD3-7-al-haltigen Ansätzen zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate kam. Diese erhöhte sich im Verlauf weiterer 24 Stunden noch einmal.

Die Inkubationsansätze mit unverändertem GD3 und 9-O-acGD3 sowie die Mediumkontrolle zeigten nach 24 Stunden keine Erhöhung der Apoptoserate. Nach 48 Stunden wurde in diesen Ansätzen dann eine leicht erhöhte Apoptoserate beobachtet. Dies kann auf die Abnahme der FCS-Konzentration zurückzuführen sein. Da sich die Zellzahl der Molt-4-Zellen unter normalen Kulturbedingungen innerhalb von 48h mindestens verdoppelt, werden die Nährstoffe des Mediums mit der Zeit verbraucht und der Anteil an toxischen Stoffwechselprodukten nimmt zu. Daher war mit einer Erhöhung der Apoptoserate in der Mediumkontrolle und in den Proben mit unwirksamen Gangliosiden zu rechnen.

Der umgekehrte Fall ist für wirksame Apoptoseinduktoren zu berücksichtigen: Resistente Subpopulationen könnten durch das Absterben der sensitiven Zellen einen

Proliferationsvorteil erlangt haben, weil ihnen nun mehr Nährstoffe des Mediums zur Verfügung standen. Ein solcher Effekt würde vor allem zu späteren Zeitpunkten dazu führen, dass die gemessene Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle verhältnismäßig niedrig ausfällt.

Als Positivkontrolle wurden Molt-4-Zellen in ein C2-Ceramid-haltiges Medium gegeben. C2-Cer zeichnet sich aufgrund der kurzen Kettenlänge der Fettsäure durch eine besonders gute Membrangängigkeit aus. C2-Cer ist ein Apoptoseinduktor der auf verschiedenen Wegen wirkt. Zum einen dient es als Präkursor einer intrazellulären GD3-Anreicherung (Malisan & Testi, 2002), zum anderen können durch C2-Cer auch direkt Caspasen aktiviert werden, die den klassischen Weg der Apoptose ausführen (Zhao et al., 2004).

Die Zellen des C2-Cer-Ansatzes wurden bereits zum ersten Messzeitpunkt nach 24 Stunden mit der Trypanblau-Ausschlussmethode als zu 100 % abgestorben beurteilt.

Da diese Methode ein spätes Stadium einer sogenannten sekundären Nekrose erfasst, erübrigte sich die SubG1-Analyse, welche nur ein frühes Stadium der Apoptose ermittelt. Auf die Darstellung der SubG1-Analyse dieser Proben wurde daher verzichtet.

Darüber hinaus sind einige Nachteile und Schwierigkeiten der Bestimmung der Apoptoserate über die SubG1-Analyse zu berücksichtigen. Die Methode nach Nicoletti erlaubt das Setzen eines Gates und damit den Ausschluss von Debris (Nicoletti et al., 1991).

Die Konsequenz daraus ist jedoch, dass falls das Gate zu weit links gesetzt wird, Partikel, die eigentlich keine Zelle mehr repräsentieren, in der Auswertung verbleiben und das Ergebnis erhöhen. Wird das Gate zu weit rechts gesetzt, verliert man möglicherweise Zellen und beeinflusst das Ergebnis negativ.

Bei der Messung der SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer kommt es zu einer Überlappung der Zellen in der S-Phase mit den Zellen in der G1-Phase, weil es in der Probe Dupletten oder größere Zellcluster geben kann, die einen doppelten oder höheren DNA-Gehalt vortäuschen. Ebenso können Aggregate aus Bruchstücken apoptotischer Zellen eine Zelle mit intaktem DNA-Gehalt imitieren.

Zellen, die aus der G2 Phase in die Apoptose gehen haben einen DNA-Gehalt, der möglicherweise im Bereich des Peaks der G0/G1 Phase liegt. Diese Zellen werden dann nicht als apoptotische Zellen erfasst. Der Messwert wird dadurch negativ beeinflusst. Ein weiterer Nachteil dürfte darin bestehen, dass die SubG1-Methode die apoptotischen Zellen erst dann detektiert, wenn ein großer Teil der DNA bereits fragmentiert wurde. Sehr frühe Phasen der Apoptose werden mit diesem Test nicht erfasst.

Neben der SubG1-Analyse wurden die Proben daher stets zusätzlich am Mikroskop über die Trypanblau-Ausschlussmethode beurteilt. Diese Methode beruht auf den Unterschieden in der Permeabilität der Plasmamembran von vitalen und apoptotischen beziehungsweise nekrotischen Zellen. Der Farbstoff wird von vitalen Zellen nicht inkorporiert.

Durch diese Methode konnten alle Ergebnisse der SubG1-Analyse als plausibel bestätigt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Apoptoserate der mit GD3-7-al inkubierten GD3-resistenten Molt-4-Zellen signifikant erhöht ist. Die Apoptoserate der mit GD3 oder 9-O-acGD3 behandelten Zellen unterscheidet sich hingegen nicht von der Mediumkontrolle.

Mit dem Inkubationsversuch an Molt-4-Zellen im Rahmen dieser Arbeit wurde bestätigt, dass GD3-7-al tatsächlich toxisch ist und als proapoptotisches Effektormolekül in Frage kommt.

4.4 Gangliosidspezifische Antikörper

4.4.1 Immunogenität von nativen und modifizierten Gangliosiden

Bei der Herstellung des monoklonalen Antikörpers gegen GD3-7-al fiel auf, dass alle drei immunisierten Mäuse eine spezifische Immunantwort gegen das oxidierte Gangliosid entwickelten.

Seit längerem wird zwischen der Immunogenität von Gangliosiden und ihrem Gehalt in gesunden Geweben der immunisierten Spezies eine umgekehrte Korrelation vermutet. In einer Untersuchung von Livingston et al. wurde für die Ganglioside GM1, GM2, GM3, GD2 sowie GD3 nach der Immunisierung von Mäusen eine unterschiedlich starke Immunogenität beobachtet. Gegen GM1 traten spontan Antikörper auf. Die übrigen Ganglioside führten in gereinigter Form ohne Zusatz eines Adjuvans nicht zu einer Immunantwort. In Anwesenheit von *Salmonella minnesota* R595 führten GM1 und GD3 zu hohen Antikörpertitern, GM2 und GD2 führten zu mäßigen Titern, während GM3 auch mit diesem Adjuvans nicht immunogen wirkte (Livingston et al., 1989).

Artifizielle Derivate von GD3 wie zum Beispiel Lactone, Amide oder hydroxylierte Derivate des Disialogangliosids führen im Gegensatz zu reinem GD3 zu einer starken Immunantwort in immunisierten Mäusen (Ritter et al., 1990).

B-Lymphozyten benötigen für den Klassenwechsel von Antikörpern des Isotyps IgM zu IgG die Signale von T-Helferzellen über CD40 und CD40L. Dies setzt nach bisherigem Grundverständnis der Entstehung einer spezifischen Immunantwort die Erkennung eines bestimmten Peptidantigens durch den passenden T-Zell-Rezeptor voraus (de Boer et al., 1993).

Für Kohlenhydratantigene wie Glycolipide ist eine T-Zell-unabhängige Immunantwort bekannt, allerdings entstehen dabei in erster Linie IgM-Antikörper (Freimer et al., 1993). Im

Bereich der Darmmukosa kann ein T-zellunabhängiger Klassenwechsel zu IgA stattfinden, wobei diese Antikörper nicht im Serum erscheinen, sondern nur als sekretorisches IgA ins Darmlumen abgegeben werden (Bergquist et al., 2006; He et al., 2007).

Auch wenn der genaue Mechanismus der Entstehung von IgG-Antikörpern gegen Glycolipidantigene nicht geklärt ist, werden solche Antikörper immer wieder beobachtet.

Für Patienten mit autoimmun bedingten peripheren Neuropathien sind diagnostisch relevante Gangliosidantikörper vom Isotyp IgG bekannt. Hier wird davon ausgegangen, dass es sich um kreuzreagierende Antikörper handelt, die primär während einer Immunreaktion gegen Infektionserreger wie *Campylobacter jejuni* induziert wurden. Diese Keime tragen auf ihrer Oberfläche Lipooligosaccharide mit sialylierten Endstrukturen, die denen der Ganglioside ähneln. Über diese molekulare Mimikry wird die T-Zell-abhängige Immunreaktion angenommen (Yuki & Odaka, 2005; Yuki, 2010).

Auch bei Tumorpatienten wurden IgG-Immunreaktionen gegen jene Ganglioside beobachtet, welche verstärkt auf Tumoren vorkommen (Mehta et al., 2010).

T-Zellen, welche speziell auf Glycolipidantigene reagieren, wurden in der Gruppe der NKT-Zellen identifiziert. Die Aufgabe dieser Zellen ist jedoch primär die Zytotoxizität, nicht die Funktion als Helferzelle.

Die Arbeitsgruppe um J.E. Park fragte sich, ob die Immunreaktion gegen GD3 von NKT-Zellen abhängig sein könnte. Glycolipide wie auch das Gangliosid GD3 können von antigenpräsentierenden Zellen auf CD1d präsentiert werden und werden auf diese Weise von invarianten NKT-Zellen erkannt. Die Arbeitsgruppe untersuchte, ob diese T-Zellen eine Antikörperantwort gegen Glycolipide unterstützen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass NKT-Zellen nicht für die T-Zell-Hilfe bei der Induktion einer IgG-Immunantwort beteiligt sind, da auch immunisierte iNKT-Zell-defiziente Mäuse und Mäuse mit komplettem Fehlen von NKT-Zellen mit gleicher Häufigkeit und mit ähnlich hohen Titern IgG-Antworten entwickelten wie Wildtyp - Tiere.

Für die Immunisierungen verwendete diese Arbeitsgruppe ein Adjuvans aus fixierten *Salmonella minnesota* R595 (Park et al., 2008).

Die Lipopolysaccharidfraktion dieses Erregers enthält Monophosphoryl Lipid A (MPL). Für MPL ist beschrieben, dass es sowohl dendritische Zellen als auch T-Zellen aktiviert. Bereits geringe Konzentrationen dieses Moleküls erhöhen die intrazellulären Calciumkonzentrationen in T-Zellen und führen (in OKT3- und anti-CD28-voraktivierten T-Zellen) zu einer erhöhten Ausprägung von CD40L.

Höhere Konzentrationen von MPL führen zu einer Reifung von dendritischen Zellen, messbar durch eine verstärkte Oberflächenausprägung von HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 (Ismaili et al., 2002).

Das für diese Arbeit bei der Immunisierung der Mäuse verwendete Adjuvans von Sigma enthält sowohl MPL als auch Trehalose 6,6'-dimycolat (TDM).

TDM ist ein Glycolipid der Oberfläche von *Mycobacterium tuberculosis*. Diese Substanz wird für die Granulombildung bei der Tuberkulose verantwortlich gemacht. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass TDM CD4⁺ T-Zellen zu einer verstärkten Zytokinproduktion veranlasst (Guidry et al., 2007).

Neben diesen Effekten könnte die Adduktbildung des Aldehyds mit Proteinen eine Rolle gespielt haben. Murray et al. beschrieben 1989 einen Aldehyd der Sialinsäure und wiesen ihn massenspektrometrisch nach. Sie postulierten die Möglichkeit einer reduktiven Aminierung zum Beispiel mit Glycin. Die Aldehydgruppe der Sialinsäure kann mit der Aminogruppe primärer Amine reagieren und im Reaktionsprodukt zu einer Schiff'schen Base führen (Murray et al., 1989).

Auch Kurien et al. beschreiben, dass oxidativ veränderte Antigene eine hohe Immunogenität besitzen. So können z.B. Aldehyde wie HNE Addukte mit Proteinen bilden, welche dann Antikörper induzieren. Solche Mechanismen werden dem Pathogenesemodell von Autoimmunerkrankungen zugrunde gelegt (Kurien et al., 2006; Kurien & Scofield, 2008). Bei einem Kondensat aus Protein und Glycolipid ist die Aldehydgruppe allerdings nicht mehr frei zugänglich. Da bei einer polyklonalen Immunantwort Antikörper gegen verschiedene Epitope entstehen, ist davon auszugehen, dass zunächst sowohl Antikörper gegen GD3-7-al als auch gegen Addukte im Serum der Mäuse vorkamen. Durch Screening mit reinem GD3-7-al und folgende Reklonierungen wurden dann die GD3-7-al spezifischen Klone selektiert.

Dieser Mechanismus liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass gegen ein Glycolipid gerichtete Antikörper vom Isotyp IgG erhalten wurden.

Von den acht auf ihren Isotyp untersuchten Antikörpern handelte es sich in fünf Fällen um IgM - Antikörper und in drei Fällen um Antikörper des Isotyps IgG.

Die Immunreaktion in allen drei Mäusen und das Auftreten von IgG - Antikörpern könnte also zusammenfassend so erklärt werden:

GD3-7-al, welches nur in wenigen Geweben natürlich vorkommt, besitzt an sich eine hohe Immunogenität. Ein Addukt aus Protein und Glycolipid-Aldehyd könnte die Immunantwort zusätzlich getriggert haben. Darüber hinaus wurde ein stark immunogenes Adjuvans eingesetzt.

4.4.2 Auswahl antikörperproduzierender Zellklone mit neuem Screeningverfahren

In vorherigen Versuchen der Generierung von gangliosidspezifischen Antikörpern in unseren Labors, erwies sich die Verwendung der ELISA-Technik als ungünstig, da hier viele falsch positive und falsch negative Ergebnisse entstanden.

Deshalb wurde eine neue Screeningmethode unter Verwendung von auf Kieselgel immobilisierten Gangliosidantigenen entwickelt.

Diese Screeningmethode erlaubt es, zwischen unspezifischem Hintergrund und Reaktion an der Auftragstelle des Antigens zu unterscheiden und ermöglicht eine semiquantitative Beurteilung der Antikörpertiter in den getesteten Überständen. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit Substrat konnten auf den miniaturisierten Kieselgelplatten unterschiedliche Farbtintensitäten beobachtet werden.

Die große Anzahl produzierender Klone ermöglichte eine Auswahl und Reklonierung der besten Hybridome. Auf diese Weise wurden Hybridome erzeugt, die Antikörper mit hoher Sensitivität in hohen Konzentrationen produzierten. Durch die Tests der Bindung an andere Ganglioside konnte eine Auswahl nach Spezifität getroffen werden. Antikörper ohne unerwünschte Kreuzreaktivitäten wurden so selektiert.

4.4.3 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers 10C6

Bereits die Untersuchung des polyklonalen Serums der Maus 3 zeigt, dass die terminale Sialinsäure eine kritische Komponente des Epitops ist. Darüber hinaus ist sie offenbar für die Immunogenität des Moleküls verantwortlich.

Das Serum reagiert mit Gangliosiden, in denen zwei Sialinsäuren gekoppelt vorkommen und deren terminale Sialinsäure oxidiert ist. Es reagiert nicht mit oxidierten Monosialogangliosiden. Auch das Disialogangliosid GD1a wird, im Gegensatz zu GD1b, nicht erkannt. In GD1a liegen beide Sialinsäuren räumlich getrennt vor, während diese in GD1b α 1-8-glycosidisch aneinander gebunden sind.

Alle aus der Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen der Maus 3 hervorgegangenen Hybridome weisen Ähnlichkeiten in der Antigenspezifität ihrer Antikörper auf. Keiner der Antikörper zeigt eine Kreuzreaktivität mit GD3 oder einem anderen nicht oxidierten Gangliosid. Die erkannten Moleküle sind Disialoganglioside mit mindestens einer oxidierten terminalen Sialinsäure.

Einzelne Hirnganglioside sowie Disialopolylactosaminylceramide wurden jedoch unterschiedlich stark angefärbt.

Der Antikörper des Zellklons 10C6 wurde für die Arbeit ausgewählt, weil er eine sehr geringe Reaktivität mit oxidierten Hirngangliosiden und Disialopolylactosaminylceramiden zeigt und weil es sich um einen IgG-Antikörper des Subtyps IgG2a handelt.

Die von 10C6 erkannten Moleküle besitzen mindestens zwei in α 1-3 glycosidischer Bindung an Galaktose gebundene Sialinsäuren. Die beiden Sialinsäuren sind in α 1-8-glycosidischer Bindung miteinander verknüpft und die terminale Sialinsäure liegt oxidiert vor.

Der Zellklon 9D7 wurde zunächst auch weiterverfolgt. Er zeigt eine starke Reaktivität auf oxidierte Hirnganglioside im Bereich der Laufhöhen von GD1a und GD1b. Bei diesem Antikörper handelt es sich um Subtyp IgG2b.

Auf die Aufreinigung der Antikörper aus den Überständen wurde verzichtet, da für die geplanten Versuche der Einsatz von antikörperhaltigen Hybridomaüberständen als ausreichend betrachtet wurde. Semiquantitative Einschätzungen von Antigenmengen konnten auch ohne Kenntnis der Konzentration getroffen werden, da die Antikörper stets im Überschuss in den Überständen vorlagen. Ein Verdünnen der Hybridomaüberstände führte zu gleichen Färbeergebnissen.

Im Vergleich zu den beiden bereits etablierten Antikörpern R24 und M-T6004 wurde eine um den Faktor 10 höhere Sensitivität ermittelt.

4.4.4 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers R24

Auch bei dem eingesetzten GD3-spezifischen Antikörper R24 handelt es sich um einen murinen monoklonalen Antikörper. Er wurde als Isotyp IgG3 charakterisiert (Pukel et al., 1982).

Dieser Antikörper ist hochspezifisch, was die terminale Sialinsäure von GD3 betrifft. Diese muss eine Neu5Ac sein, damit R24 bindet, GD3 mit endständiger Neu5Gc wird hingegen nicht erkannt. Die an die Galaktose gebundene innere Sialinsäure kann hingegen sowohl Neu5Ac als auch Neu5Gc sein, ohne dass dies einen Einfluss auf die Bindung von R24 hätte (Tai et al., 1988).

Es besteht eine Kreuzreaktivität zu GT1a und GQ1b sowie Disialoglobosid (DSPG) (Tai et al., 1988, Watarai et al. 1991). R24 bindet nicht an GD3, dessen endständige Neu5Ac artifiziell verändert ist (Cheresh, 1986).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, trifft dies auch für GD3-7-al zu. R24 bindet nicht an oxidiertes GD3.

4.4.5 Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers M-T6004

Bei dem Antikörper M-T6004 handelt es sich um ein Immunglobulin Klasse M, welches die Struktur 9-O-acGD3 erkennt. Sein Bindungsverhalten wird als identisch mit dem des Antikörpers UM4D4 beschrieben, welcher als Referenzantikörper für das CD60b-Antigen (9-O-acGD3) gilt. Er reagiert nicht mit GD3 und nicht mit 7-O-acetyl-GD3 (Knip et al., 2006). Auch an GD3-7-al bindet M-T6004 nicht. Es traten nie Übereinstimmungen in den Färbungen mit 10C6 und M-T6004 auf.

4.4.6 Nutzbarkeit des monoklonalen Antikörpers 10C6 für die Durchflusszytometrie und die indirekte Immunfluoreszenz

Um zu testen ob der Hybridomaüberstand des Zellklons 10C6 für die Verwendung in der Durchflusszytometrie geeignet ist, wurden HL60-Zellen genutzt und mit einer definierten Menge GD3-7-al inkubiert. Da Ganglioside Membranbestandteile sind, die mit ihrem Ceramidteil in der Membran verankert vorkommen, wurde die Einlagerung eines Teils des GD3-7-al in die Membran erwartet. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit 10C6 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen konnten also erfolgen. Dabei musste stets berücksichtigt bleiben, dass der Antikörper auch andere oxidierte Disialoganglioside erkennt. Eine genaue Differenzierung der angefärbten Antigene ist dabei nicht möglich. Dies konnte nur über das polaritätsabhängige Laufverhalten in der Kieselgelchromatographie erfolgen.

Die Einlagerung von GD3-7-al in die Membran wurde mit der Methode der Indirekten Immunfluoreszenz bestätigt. Auch dieses Verfahren konnte also für den Nachweis des Antigens herangezogen werden.

4.5 Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind sauerstoffhaltige Moleküle mit sehr hoher Reaktionsfähigkeit. Zu diesen zählen freie Radikale z.B. das Hydroxylradikal sowie Superoxid, aber auch nicht radikale Stoffe z.B. Wasserstoffperoxid.

Freie Radikale sind Stoffe, die Atome mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen in einem äußeren Orbital enthalten. Sie können auf dem Wege der Sauerstoffreduktion oder

auf enzymatischem und nicht-enzymatischem Weg entstehen. Wasserstoffperoxid selbst ist kein freies Radikal, kann aber über die Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgesetzt werden (Thannickal & Fanburg, 2000).

Die Fenton-Reaktion ist die nach Ihrem Entdecker H.J.H. Fenton benannte Oxidation von organischen Substraten mit Wasserstoffperoxid in saurem Milieu. Diese Reaktion wird durch Eisensalze katalysiert. Sie ist die Hauptquelle von freien Sauerstoffradikalen in biologischen Systemen und wird damit als Ursache für oxidativen Stress in der Zelle angesehen (Koppenol, 1993).

In der Atmungskette der Mitochondrien entstehen auch unter physiologischen Bedingungen freie Sauerstoffradikale. Diese werden durch das Enzym Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) zu Wasserstoffperoxid metabolisiert. MnSOD ist überwiegend in der Mitochondrienmatrix lokalisiert und stellt den primären Schutzmechanismus der Mitochondrien vor freien Radikalen dar (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

Die Radikale, die in der Atmungskette entstehen, werden zu H_2O_2 umgewandelt, welches wiederum mit Gluthathion abgebaut wird, da es selbst auch toxisch wäre. Die Menge verfügbaren Gluthathions stellt in diesem Zusammenhang den begrenzenden Faktor des Schutzes dar. Übersteigt die Menge des anfallenden H_2O_2 die antioxidative Kapazität, kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate (Armstrong et al., 2002).

4.5.1 Darstellung von GD3-7-al in vitro unter Bedingungen des oxidativen Stresses

GD3 ist prinzipiell selektiv an der glycerinartigen Seitenkette der terminalen Sialinsäure oxidierbar. Dabei entsteht das Produkt GD3-7-al (Brenner et al., 2009). Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, kann dieses Produkt nicht nur durch die artifizielle Oxidation mit Natriumperjodat entstehen, sondern auch durch Hydroxylradikale, die im Rahmen einer Fenton-Reaktion aus Wasserstoffperoxid entstehen. An den Mitochondrien sind ähnliche Voraussetzungen gegeben, da dort sowohl Eisenionen als auch reaktive Sauerstoffspezies zu finden sind.

Werden initial Mitochondrien geschädigt, kann GD3 oxidiert werden und könnte dann massiv weitere Mitochondrien über die Öffnung der PTPC zerstören. Damit könnte ein Verstärkungseffekt erreicht werden und der *point of no return* im Ablauf des programmierten Zelltodes überschritten werden.

Hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid kommen in vivo unter Bedingungen des oxidativen Stresses durchaus vor. Zum Beispiel bei der Hypoxie

infolge eines Infarktes steigen die Gehalte an Wasserstoffperoxid im betroffenen Gewebe enorm an.

In einer Untersuchung zur antioxidativen Wirkung des Arzneistoffes 21-Aminosteroid, welcher zur Behandlung von Schlaganfallpatienten eingesetzt wird, wurde die Wasserstoffperoxidfreisetzung aktivierter Leukozyten ermittelt. Ohne den Einsatz des Medikaments konnten in der Umgebung polymorphkerniger Zellen Konzentrationen von 95 μM und in der Umgebung von Monozyten 35 μM Wasserstoffperoxid ermittelt werden (Fisher et al., 1995). Granger & Korthuis benennen Konzentrationen von 300 μM in der Umgebung aktivierter Neutrophiler, die bei der Reperfusion in ischämisch geschädigtes Gewebe einwandern (Granger & Korthuis, 1995).

Intrazellulär könnten punktuell weit höhere Konzentrationen entstehen.

Die Herstellung von GD3-7-al unter Einsatz von Wasserstoffperoxid und Eisenionen ergab ein Produkt ab einer Konzentration beider Substanzen von 1 mM. Möglicherweise entsteht das Produkt GD3-7-al auch unterhalb dieser Konzentrationen. Die Menge lag dann jedoch unter der Nachweisgrenze der angewendeten Detektionsmethode.

Da die Intensität der Banden von der Konzentration der oxidativen Reagenzien und nicht von der Menge des eingesetzten GD3 abhängen, scheint hier die Verfügbarkeit der freien Radikale der begrenzende Faktor zu sein, beziehungsweise das Gangliosid im Überschuss vorzuliegen. Die Hydroxylradikale werden bei der Entstehung von GD3-7-al offenbar abgefangen.

4.6 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd in biologischen Systemen

4.6.1 Gewebefärbungen

Bei den Färbungen an kommerziell erhältlichen hitzefixierten Primatengewebeschnitten konnte GD3 in nahezu jedem Präparat gefunden werden. Lediglich periphere Nerven sowie Lebergewebe erwiesen sich als negativ. Auch wenn die GD3-Gehalte als niedrig beschrieben werden (Dippold et al., 1985), könnten durch die Bindung des R24 die Nebenwirkungen, die sich bei der Behandlung von Tumorpatienten mit diesem Antikörper ergaben, erklärt werden.

Chen und Varki fanden 9-O-acGD3 unter anderem in Kleinhirn (Chen & Varki, 2002). Dies konnte am im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kleinhirngewebeschnitt vom Affen nicht bestätigt werden. Dafür wurde 9-O-acGD3 in den Geweben exkretorischer Drüsen wie Speicheldrüse und Pankreas gefunden. Für die Unterkieferspeicheldrüse des Rindes ist das Vorkommen einer Sialat-O-Acetyltransferase beschrieben, welche die Sialomucine des

Speichels O-acetyliert (Corfield et al., 1991). Eine O-Acetylierung der Ganglioside in diesem Gewebe ist daher auch sehr wahrscheinlich.

Strukturen mit oxidiertem Sialinsäure wurden nur in fetalem Darmgewebe nachgewiesen. Schwache Anfärbungen mit dem Antikörper 10C6 gab es darüber hinaus auf dem Gewebeschnitt von fetaler Milz sowie auf einigen Tumorgeweben. Diese Anfärbungen unterscheiden sich jedoch kaum von denen der Mediumkontrolle, können also nicht sicher als spezifisch betrachtet werden.

Das mögliche Vorkommen in fetalem Gewebe legt nahe, dass GD3-7-al nicht nur ein Apoptosemediator ist, sondern möglicherweise auch ein Molekül, dessen Auftreten vom Grad der Differenzierung von Zellen oder Geweben abhängig ist.

Dafür spricht auch die Anfärbung der Oberfläche eines Teils der AML-Blasten und der Monozyten einiger Spender.

4.6.2 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd in Tumorzellen

Um das Vorkommen der drei GD3-Derivate in malignen Geweben und Zellen zu untersuchen, wurden zunächst Lipidextrakte von Tumorzelllinien hergestellt und nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie immunchemisch gefärbt.

Dabei kam es für einige Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Wie bereits aus vorangegangenen Versuchen in unseren Labors sowie aus den Beobachtungen verschiedener Autoren hervorgeht, haben Zellen die Eigenschaft, im Verlaufe der Kulturdauer ihr Gangliosidspektrum zu verändern. Thisbe K. Lindhorst hält in „*Chemie in unserer Zeit*“ fest, dass Unterschiede im Glycosylierungsmuster bei Zellen gleichen Typs häufig vorkommen und verwendet dafür den Begriff der „Mikroheterogenität des Glycosylierungsmusters“. Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, dass die Biosynthese der Oligosaccharide von den Glycosyltransferasen abhängt und nicht unmittelbar gencodiert ist. Die Aktivität der Enzyme der einzelnen Biosyntheseschritte hängt von zahlreichen Faktoren ab, unter anderem vom Status der Zelle (Lindhorst, 2000).

Tsuchida et al. beobachteten eine stark variierende Gangliosidgehalte je nach Kulturbedingungen. So unterschieden sich Ganglioside von frisch autopsierten Melanomen stark von denen, die daraus generierten Melanomzelllinien. Werden die Melanomzellen dieser Zelllinien in Nacktmäuse implantiert, entwickelt sich wieder das ursprüngliche Spektrum der Ganglioside. Daher kann angenommen werden, dass die Ausprägung sehr stark von den Wachstumsbedingungen der Zelle abhängt (Tsuchida et al., 1987). Für Melanome und daraus generierte Zelllinien ist die Ausprägung von GD3 (Pukel et al., 1982;

Carubia et al., 1984; Cheresh et al., 1984 a; Dippold et al., 1985; Ariga et al., 2008; Ohkawa et al., 2010; Lo et al., 2010) und seinem 9-O-acetylierten Derivat (Cheresh et al., 1984 b; Ravindranath et al., 1989; Manzi et al., 1990; Ariga et al., 2008) durch zahlreiche Autoren beschrieben worden. Auch in den verwendeten Melanomzelllinien dieser Arbeit (Ma-Mel-11, Ma-Mel-95, SK-Mel-23), wurden sowohl GD3, als auch sein 9-O-acetyliertes Derivat in allen Lipidextraktionen nachgewiesen.

Auch die T-Zell-Lymphomlinie Molt-4 ist ein Beispiel für die Heterogenität des Gangliosidspektrums. In früheren Untersuchungen in unserem Labor wurde bereits gezeigt, dass die Zelllinie Molt-4 keine stabile Gangliosidausprägung aufweist. So wurde diese Zelllinie zu Beginn der Kultivierung stark positiv für GD3 und sein 9-O-acetyliertes Derivat getestet und erwies sich zu einem späteren Zeitpunkt als negativ für beide Ganglioside (Knies et al., 2006). Pukel et al. fanden im Rahmen der Charakterisierung des GD3-spezifischen Antikörpers R24 in Molt-4-Zellen vor allem die Ganglioside GM3 und GD3 (Pukel et al., 1982). Dieses Gangliosidspektrum wiesen Molt-4-Zellen wenige Tage nach der Inkulturnahme auch unter unseren Laborbedingungen auf (Schulze, 2008). Nach Fomina-Ageeva et al. sind die Hauptganglioside in Molt-4-Zellen hingegen vor allem Monosialoganglioside sowie das Disialogangliosid GD1a (Fomina-Ageeva et al., 1987). Dieses Gangliosidspektrum wurde bei dieser Zelllinie in unserem Labor erst nach längerer Kulturdauer gefunden. Darüber hinaus wurden je nach Kulturdauer stark schwankende 9-O-acGD3-Gehalte beobachtet (Schulze, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Molt-4-Zellen mehrfach schwach positiv für GD3 und 9-O-acGD3 getestet. Dies konnte sowohl im Lipidextrakt als auch nach Oberflächenfärbung in der Durchflusszytometrie beobachtet werden.

Der Lipidextrakt der Zelllinie Jurkat, einer akuten T-Zell-Leukämie wurde zu früheren Zeitpunkten in unserem Labor unter Verwendung eines polyklonalen Mausserums für GD3-7-al positiv getestet (Knies, unveröffentlichte Daten, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wies diese Zelllinie dann keines der GD3-Derivate auf. Auch die Angaben in der Literatur zu dieser Zelllinie differieren.

Suzuki et al. fanden in Jurkat kein GD3 (Suzuki et al., 1987), während Azuma et al. Jurkat als GD3-positive Zelllinie beschreiben, deren GD3-Gehalt der Oberfläche unter Behandlung mit Etoposid abnimmt (Azuma et al., 2007).

Die promyelozytäre Leukämie HL60 wurde zu Beginn der Arbeiten an diesem Thema positiv für GD3 und GD3-7-al getestet. Dies konnte dann in keinem der späteren Versuche erneut gefunden werden.

In T47D, einer Linie eines dukalen Mammakarzinoms konnte zunächst keines der GD3-Derivate nachgewiesen werden. Nach längerer Kultur dieser Zelllinie wurde dann in geringem Umfang GD3 und auch sein oxidiertes Derivat gefunden. Das verstärkte Auftreten

von GD3 in Tumoren der Brust ist bereits früher beschrieben worden (Diatlovitskaia, 1991). Auch auf einem entsprechenden Gewebeschnitt eines Mammakarzinoms konnte mit der Technik der Immunfluoreszenz eine starke Anfärbung mit R24 (anti-GD3) und jeweils eine schwache Färbung mit M-T6004 (anti-9-O-acGD3) sowie 10C6 (anti-GD3-7-al) gefunden werden.

GD3 und sein oxidiertes Derivat GD3-7-al konnten reproduzierbar im Lipidextrakt von HEp-2, einer Epitheliomzelllinie eines Larynxkarzinoms, gefunden werden.

Für die Nachweismethode der Lipidextraktion wird eine sehr große Zellmenge benötigt. Mit Zellzahlen von 1×10^7 liegt man möglicherweise für einige der untersuchten Substanzen noch immer unterhalb oder nahe an der Nachweisgrenze. Auch dies könnte für einen Teil der zwischen schwach positiv und negativ differierenden Ergebnisse verantwortlich sein.

In den durchflusszytometrisch untersuchten AML-Blasten wurde für einige Patienten zunächst für einen großen Anteil der Zellen eine Anfärbung mit dem anti-GD3-7-al-Antikörper 10C6 erzielt, welcher nach Kryokonservierung und weiterer Kultivierung abnahm. Dies könnte an den in der Kulturflasche vorherrschenden Bedingungen oder am Wegfall der Medikation liegen. Über den klinischen Verlauf und den Zeitraum seit der Diagnosestellung sowie die Vorbehandlung standen leider keine Informationen zur Verfügung.

Da es unter Bestrahlung und Chemotherapie zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies kommt, ist auch möglich, dass GD3-7-al im Zuge der Therapie induziert wurde.

Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Frage, ob unter Einsatz des richtigen Stimulus eine Induktion der Gangliosidantigene möglich wäre.

Induktionsversuche mit verschiedenen Stimuli wären mit der Nachweismethode der Lipidextraktion aufgrund der hohen benötigten Zellzahlen entsprechend material- und kostenintensiv.

Der Vorteil dieser für den Gangliosidnachweis etablierten Methode ist, dass nicht nur auf der Zelloberfläche vorkommende, sondern auch intrazellulär vorkommende Ganglioside erfasst werden. Eine entsprechende intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie birgt prinzipiell die Gefahr, durch Fixierung, Permeabilisierungs- und Waschschrte einen Teil der Ganglioside zu verlieren. Dennoch wurden die folgenden Induktionsversuche mit der Technik der Durchflusszytometrie untersucht. Bei Fixierung und Permeabilisierung wurde dabei auf Gangliosidlösungsmittel wie z.B. Methanol verzichtet, um derartige Verluste zu vermeiden.

4.6.3 Vorkommen von GD3-7-Aldehyd auf peripheren mononukleären Blutzellen

Um das Vorkommen von GD3-7-al auf PBMCs zu untersuchen, wurde zunächst von mehreren Spendern jeweils ein Lipidextrakt aus mit Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) hergestellt und chromatografisch getrennt.

Mit dem GD3-spezifischen Antikörper R24 und dem 9-O-acGD3-spezifischen M-T6004 konnten keine Banden angefärbt werden. GD3 und 9-O-acGD3 wären jedoch zu erwarten gewesen, da GD3 auf der Oberfläche eines Anteils von 10% der T- gefunden wird (Ren et al., 2001). Das Vorkommen von 9-O-acGD3 ebenfalls für T-Zellen beschrieben worden (Kniep et al., 1993). Da die T-Zellen nur einen Teil der extrahierten Probe ausmachten und die Sensitivität der Antikörper R24 und M-T6004 als niedriger eingestuft werden muss als die Sensitivität von 10C6, ist anzunehmen, dass die Gehalte von GD3 und 9-O-acGD3 unter der Nachweisgrenze lagen.

GD3-7-al wurde hingegen gefunden. Die mit dem monoklonalen Antikörper 10C6 angefärbten Banden entsprechen auch in ihrer Laufhöhe dem GD3-7-al-Standard. Die nachgewiesene Substanz konnte somit eindeutig als GD3-7-al identifiziert werden. Ihre Menge ist in Anbetracht der 10-fach höheren Sensitivität von 10C6 gegenüber R24 und M-T6004 jedoch als sehr gering einzuschätzen.

Um zu ermitteln, welche der Zellpopulation GD3-7-al auf der Oberfläche aufweist, wurden mittels Durchflusszytometrie einzelne Zellpopulationen identifiziert und mit 10C6 untersucht. In Kombination mit der Anfärbung von Oberflächenmarkern wurde nach der GD3-7-al positiven Zellpopulation gesucht. Dabei wurden T-Zellen über die Ausprägung von CD3, B-Lymphozyten über CD20, NK-Zellen über CD56 sowie Monozyten über CD14 identifiziert. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich die Monozyten mit 10C6 anfärbbar waren.

In den ersten Untersuchungen wurde das Durchflusszytometer FACS-Calibur eingesetzt und lediglich der Sekundärantikörper als Negativkontrolle mitgeführt. Spätere Versuche mit weiteren Spendern unter Einsatz des Durchflusszytometers MACS-Quant und unter Verwendung einer IgG2a-Isotypkontrolle ergaben für alle weiteren Spender negative Ergebnisse. Es muss darüber hinaus auch hier berücksichtigt werden, dass 10C6 als sensibler eingestuft wurde, als die Detektionssysteme der beiden anderen GD3-Derivate mit den Antikörpern R24 und M-T6004.

In folgenden Versuchen wurde auch in Granulozyten, Stän-dendritischen Zellen und durch in vitro aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (Mo-DCs) nach dem oxidierten GD3-Derivat gesucht. Diese Populationen erwiesen sich als negativ.

Der Umstand, dass GD3-7-al auf einem Teil der AML-Blasten und Monozyten, aber nicht auf dendritischen Zellen oder Granulozyten auftritt, spricht für ein differenzierungsabhängiges Molekül.

Veränderungen im Gangliosidspektrum wurden auch bei der Differenzierung von Blasten der chronischen myeloischen Leukämie zu Granulozyten sowie bei der Differenzierung von HL60 beschrieben. Die Autoren um Nojiri beobachteten mit zunehmender Differenzierung der Zellen eine Zunahme der komplexeren Ganglioside mit längeren Kohlenhydratketten, während es zu einer Abnahme der Ganglioside mit einfacher Kohlenhydratstruktur kam (Nojiri et al., 1985).

4.7 Tumortargeting mit GD3-7-Aldehyd

4.7.1 Untersuchung des Vorkommens von GD3-7-Aldehyd in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies

Die Larynxkarzinomzelllinie HEP-2 erwies sich bei der Untersuchung der daraus hergestellten Lipidextrakte sowie bei intrazellulärer Färbung und Untersuchung mit Hilfe der Durchflusszytometrie als GD3-7-al-haltig. Bei Färbungen auf der Oberfläche der Zellen, konnte das Molekül jedoch nicht nachgewiesen werden. Um eine Anreicherung von GD3-7-al und damit auch eine Verlagerung des Moleküls auf die Zelloberfläche zu erreichen, wurde die Zelllinie durch UV-Bestrahlung mit einer Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies konfrontiert. Dieser Anstieg des oxidativen Potentials im Inneren der Zellen wurde durch den Farbstoff DCFDA gezeigt. Die reduzierte farblose Form dieses Stoffes wird von Zellen inkorporiert. Durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies kann dieser Stoff oxidiert werden und entwickelt dabei eine grüne Fluoreszenz die durchflusszytometrisch messbar ist. Der dabei erhobene mittlere Fluoreszenzindex (MFI) korreliert mit dem Auftreten von ROS.

Da das Vorkommen von GD3-7-al in HEP-2-Zellen nicht zur Apoptose führt, muss von einer Resistenz dieser Zelllinie ausgegangen werden. Eine erhöhte Resistenz dieser Zelllinie gegenüber Wasserstoffperoxid ist bereits beschrieben worden. Diese Resistenz ist dann besonders stark ausgeprägt, wenn die Zellen konfluent wachsen und es zu einer Zell-Zell-Adhäsion kommt (Mazurov et al., 2003).

Zur Überprüfung, ob es sich bei der durchflusszytometrisch detektierten Substanz um GD3-7-al handelt wurde ein Lipidextrakt von unbehandelten und von mit H_2O_2 gestressten Zellen hergestellt und dünnschichtchromatographisch untersucht. Da nur auf der Höhe von GD3-7-al eine Bande nachgewiesen wurde, konnte die Substanz eindeutig als oxidiertes Derivat von GD3 identifiziert werden. Interessant ist auch, dass es in der H_2O_2 -behandelten Probe zu einer stärkeren Bande, also einer Anreicherung der Substanz gekommen ist.

Durch den Einsatz geeigneter Stimuli, die einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies bewirken, ist also eine Induktion von GD3-7-al möglich. Auf diese Weise wäre es auch möglich, diese Antigenstruktur auf der Zelloberfläche als Zielstruktur für eine immunologische Tumorthherapie zugänglich zu machen.

Auch für die Melanomzelllinie SK-Mel-23 konnte dieser Effekt gezeigt werden. Diese Zelllinie reagierte allerdings auf die verwendete UV-Strahlendosis bereits mit einer höheren Apoptoserate. Die DCFDA-Färbung weist aufgrund des Anteils apoptotischer Zellen einen niedrigeren MFI auf, da die Membran apoptotischer Zellen nicht mehr in der Lage ist, den Farbstoff im Inneren der Zelle zu halten.

4.7.2 Dekorationsversuche HL60

Bereits bei der Überprüfung des Antikörpers auf seine Eignung für durchflusszytometrische Untersuchungen, fiel auf, dass es in den verwendeten HL60-Zellen nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate kam.

Innerhalb kürzester Zeit wurde das Gangliosid GD3-7-al in die Oberfläche der HL60-Zellen eingebaut und blieb dort bis zu 48 h deutlich nachweisbar. Nach 72 h konnte nur noch ein geringer Unterschied zur nicht mit GD3-7-al behandelten Kontrolle beobachtet werden.

Dieses Verschwinden des Antigens könnte auf die Endozytose durch die Zellen oder aber auf die Reduktion des Aldehyds durch Bestandteile des Mediums wie Glutathion zurückzuführen sein.

Da in HL60 bei der Inkubation mit dem oxidierten Gangliosid keine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass es von diesen Zellen nicht aufgenommen wurde.

Die Endozytosefähigkeit des jeweiligen Zelltyps ist möglicherweise ausschlaggebend dafür, ob von außen zugeführtes GD3-7-al aufgenommen wird und intrazellulär als Apoptosemediator wirken kann. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Zelltypen die Fähigkeit besitzen, GD3-7-al zu internalisieren und zu entgiften.

Aufgrund der Eigenschaft des Glycolipids in die Membran von Zellen eingelagert zu werden, eröffnet sich die Möglichkeit, in der unmittelbaren Umgebung des Tumors im Rahmen einer immunologischen Tumorthherapie „collateral damage“ zu erzeugen. Die Freisetzung von Gangliosiden aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen kann zu einer Dekoration der benachbarten Zellen des Tumors führen. So könnten beispielsweise Gefäße, welche den Tumor versorgen, beschädigt werden, ohne dass eine systemische Wirkung wie bei klassischen Zytostatika erfolgt.

4.7.3 Einbau veränderter Sialinsäuren als Therapiemodell

Bei der Bezeichnung der Ganglioside erfolgt in der Regel keine Differenzierung nach der Art der Sialinsäure, auch die Kettenlängen der Bestandteile des Ceramidanteils bleiben unberücksichtigt.

Die Art der Sialinsäure hat durchaus enormen Einfluss auf die Immunogenität des Gesamtmoleküls, während die Kettenlänge des hydrophoben Anteils Auswirkungen auf die physikochemischen Eigenschaften hat und damit das Verhalten des Moleküls in Membranen stark beeinflusst (Kolter et al., 2002).

Bekannt ist, dass Melanomzellen in hohem Maße GD3 ausprägen (Dippold et al., 1985; Ohkawa et al., 2010; Lo et al., 2010). Für dessen Herstellung nehmen sie bereitwillig die extern zugeführte Präkursorsubstanz N-acetyl-Mannosamin auf, beziehen sie in die Synthese der Sialinsäure ein und nutzen diese für die Gangliosidsynthese (Jacobs et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe um Zou nutzte diesen Effekt zur Etablierung eines neuen Tumor-Targeting Systems. N-acetyl-Mannosamin wurde artifiziell in drei Varianten verändert, es wurde N-propionyl-, N-butyryl- und N-benzoyl-Mannosamin erzeugt. Wurden die Melanomzellen (SK-Mel 28) mit diesen Präkursorsubstanzen inkubiert, synthetisierten sie Sialinsäuren mit den genannten Gruppen und bauten diese in das Gangliosid GD3 ein. Gegen diese artifiziellen GD3-Varianten wurden monoklonale Antikörper erzeugt.

Im Tiermodell Maus konnte gezeigt werden, dass das Anwachsen von SK-Mel-28 Tumoren wesentlich verringert werden konnte, wenn die Tiere mit der Präkursorsubstanz sowie dem entsprechenden Antikörper behandelt wurden (Zou et al., 2004). Dieses Prinzip wurde von einer anderen Arbeitsgruppe auch für GM3-positive Tumore beschrieben (Chefalo et al., 2006). Eine ähnliche Vorgehensweise ist auch für GD3-7-al denkbar.

Eine Kombinationstherapie aus der Gabe oxidiert Sialinsäure und einer anschließenden Behandlung mit einem GD3-7-al-spezifischen Antikörper würde diesem Therapiemodell entsprechen. Zellen nehmen bereitwillig von außen zugeführte Sialinsäure auf und bauen sie in Glycokonjugate ein (Oetke et al., 2001; Bardor et al., 2005; Gabri et al. 2009).

Tumore, die schneller wachsen als gesundes Gewebe und die darüber hinaus bestimmte Ganglioside verstärkt ausprägen haben eine höhere Gangliosidsyntheserate als normale Zellen. Daher würde sich das artifizielle Produkt in erster Linie in den Tumoren anreichern, die dann mit dem Antikörper opsonisiert werden können.

Die proapoptotischen Eigenschaften von GD3-7-al könnten hier ebenfalls hilfreich sein. Als Zwischenprodukt der Synthese höherer Ganglioside entsteht unter anderem GD3. Mit der Zufuhr oxidiert Sialinsäure als Präkursor für die Gangliosidsynthese könnte auf diesem Weg das proapoptotisch wirksame Molekül GD3-7-al entstehen. Für diesen Weg der Apoptose sensitive Zellen könnten auf diese Weise direkt in den programmierten Zelltod geführt werden. Resistente Zellen hingegen könnten im zweiten Therapieschritt mit dem GD3-7-al spezifischen Antikörper eliminiert werden.

Bei der Zerstörung GD3-7-al-haltiger Tumorzellen durch Apoptose oder zellvermittelte Zytotoxizität würde ein Teil des GD3-7-al in die Umgebung des Tumors abgegeben. Da Zellen GD3-7-al in ihre Oberfläche einlagern, wären diese Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors auch der Antikörpertherapie zugänglich. Im Bereich des Tumors

befindliche Gefäße wären davon ebenfalls betroffen. Die Versorgung der Tumorzellen würde dadurch zusätzlich eingeschränkt.

Ein weiterer Vorteil von GD3-7-al als Tumortarget wäre die Induzierbarkeit unter Bedingungen oxidativen Stresses.

Wie in den Bestrahlungsversuchen mit UV-Licht gezeigt werden konnte, kann das von 10C6 erkannte Antigen in einigen Zelltypen auf der Oberfläche induziert werden.

Da es im Gegensatz zu GD3 nur in wenigen Geweben vorkommt, dürften die zu erwartenden Nebenwirkungen einer Behandlung mit von 10C6 abgeleiteten Biologika wesentlich geringer ausfallen, als bei einer Behandlung mit dem GD3-spezifischen Antikörper R24 oder seinen humanisierten Varianten.

Bei einer Behandlung mit einem GD3-7-al-spezifischen Antikörper könnte für einige Patienten mit einem vorübergehenden Verlust eines Teils der Monozyten zu rechnen sein. Da jedoch andere Professionelle Antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. dendritische Zellen das mit 10C6 reagierende Antigen nicht enthalten, sollten diese Zellpopulationen von der Therapie unbeeinflusst bleiben. Eine wichtige Voraussetzung für eine nebenwirkungsarme Therapie wäre daher erfüllt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass GD3-7-al auf mehreren Wegen zur Tumorbekämpfung genutzt werden könnte:

Durch eine lokale Vorbehandlung von GD3-haltigen Tumoren wie z.B. Melanomen mit Natriumperjodat könnte GD3-7-al als Zielstruktur induziert werden. Zellen, welche intrazellulär GD3-7-al enthalten, können durch das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies dazu veranlasst werden, dieses oxidierte Gangliosid auf die Zelloberfläche zu verlagern. Auf diese Weise ergibt sich eine Zielstruktur für eine Antikörpertherapie. Der passende spezifische Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Extern zugeführtes GD3-7-al kann in die Membran von Zellen eingelagert werden. Wird GD3-7-al aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen freigesetzt, könnte es in die Oberfläche benachbarter Zellen eingelagert werden und dort ebenso als Zielstruktur für die Antikörpertherapie dienen. So könnte beispielsweise durch die Schädigung von Gefäßen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors dessen Versorgung vermindert werden.

Wie gezeigt wurde, besitzt GD3-7-al proapoptotische Eigenschaften. Auch durch diese Toxizität könnten Tumorzellen sowie Zellen in der Umgebung des Tumors eliminiert werden. Ein großer Vorteil der Verwendung von GD3-7-al gegenüber GD3 als antigener Zielstruktur besteht in dem geringen Vorkommen von GD3-7-al in gesunden Geweben. Daraus resultiert ein geringeres Risiko für Nebenwirkungen.

4.8 Ausblick

Zur Funktion von Gangliosiden wurden bislang viele Vermutungen aufgestellt und wenige Tatsachen abschließend bewiesen.

Auch die Funktion von GD3 und seinen Derivaten 9-O-acGD3 und GD3-7-al kann nicht als aufgeklärt betrachtet werden.

Der im Rahmen dieser Arbeit generierte GD3-7-al-spezifische monoklonale Antikörper bietet nun die Möglichkeit, das Wissen auf diesem Gebiet zu vertiefen.

Zu klären wäre in der Zukunft, ob es sich bei der Entstehung des oxidativ veränderten GD3 um einen enzymatisch gesteuerten Prozess handelt oder dieses Produkt spontan unter definierten Bedingungen in biologischen Systemen entsteht. Denkbar wäre, dass es sich bei GD3 und seinem oxidierten Produkt GD3-7-al um ein Sensorsystem für oxidativen Stress handelt.

Zu klären wäre, ob es eine bestimmte GD3-7-al positive Subklasse der Monozyten gibt. Möglicherweise charakterisiert GD3-7-al ein bestimmtes Differenzierungsstadium dieser myeloischen Zellen. Dafür spricht beispielsweise, dass ein Teil der untersuchten AML-Blasten mit 10C6 angefärbt wurde und fetale Gewebe in der Indirekten Immunfluoreszenz eine leichte Färbung zeigten, während stark ausdifferenzierte Zelltypen und Gewebe nicht mit 10C6 reagierten, also kein GD3-7-al enthielten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob GD3-7-al auf hämatopoetischen Stammzellen vorkommt.

Untersucht werden sollte, in welcher Versuchstierspezies ein ähnliches Vorkommen von GD3-7-al gefunden werden kann. Dann wäre die Funktionsaufklärung anhand von Tiermodellen möglich.

Um die Nutzbarkeit des oxidierten Gangliosids GD3-7-al und des Antikörpers 10C6 für die Tumorthherapie zu untermauern, müssen zunächst Schritte zur weiteren Erforschung der Funktion des Antigens sowie Untersuchungen zur Wirkung des Antikörpers unternommen werden.

Neben der Nutzung der proapoptotische Wirkung von GD3-7-al könnte die Induzierbarkeit des Moleküls auf der Oberfläche von Tumorzellen therapeutisch eingesetzt werden. Es wäre eine Kombination aus lokaler Natriumperjodatbehandlung oder photodynamischer Therapie mit einem immunologischen Ansatz denkbar. Der Gehalt an oxidiertem GD3 könnte in Tumorgewebe durch Applikation eines natriumperjodathaltigen Präparates oder durch UV-

Bestrahlung gesteigert werden. Als weitere, bislang nicht untersuchte Möglichkeit, käme die Integration oxidiert Sialinsäure in die Ganglioside der Tumorzellen in Frage.

Tumorzellen, die durch den Kontakt mit dem oxidierten Glycolipid nicht apoptotisch werden, könnten dann mit einem GD3-7-al-spezifischen Antikörper markiert werden. Es muss überprüft werden, inwieweit dieser in der Lage ist, Effektorzellen oder Komplementkomponenten zur Tötung der Tumorzellen zu veranlassen. Zunächst sollte dies durch weitere in vitro Experimente belegt werden. Im Anschluss daran muss das System im Tierversuch bestätigt werden.

Würde sich GD3-7-al als geeignete Zielstruktur für eine immunologische Tumorthherapie erweisen, könnte der zunächst murine Antikörper 10C6 als Basis humanisierter Antikörper dienen. Die Verwendung der gangliosidspezifischen Region des Antikörpers 10C6 für die Generierung bispezifischer Antikörperkonstruktionen wäre gleichermaßen denkbar.

5 Zusammenfassung

Glycosphingolipide sind eine Gruppe von amphipatischen Membran- und Strukturlipiden, welche aus einem Molekül des Aminoalkohols Sphingosin oder einem seiner Derivate, einer langkettigen Fettsäure und einem Kohlenhydratrest als polare Kopfgruppe zusammengesetzt sind. Eine Subgruppe dieser Substanzen stellen die Ganglioside dar, welche durch das Vorkommen von Sialinsäure als Bestandteil ihrer Glykankette charakterisiert sind.

Das Gangliosid GD3 ist als tumorassoziiertes Antigen auf der Oberfläche neuroektodermaler Tumore sowie als proapoptotisch wirkender Lipidmediator beschrieben. Seine biologischen Funktionen und der genaue Wirkmechanismus im Rahmen der Apoptose sind bisher aber unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass nicht GD3 selbst, sondern sein oxidiertes Derivat das eigentliche Effektormolekül darstellt. Eine minimale Veränderung des GD3-Moleküls, die 9-O-Acetylierung der Seitenkette der terminalen Sialinsäure, hebt die proapoptotische Wirkung des Gangliosids auf. Tumorzellen, in denen das Enzym 9-O-Acetyltransferase aktiv ist, können der Apoptose auf diese Weise entgehen.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, Vorkommen und Funktion des bis dahin nur artifiziell generierten oxidierten GD3-Derivates zu untersuchen. Es war zu analysieren, welche Auswirkungen oxidiertes GD3 auf das Überleben von GD3-resistenten Tumorzellen hat. Es sollte geprüft werden, ob GD3-7-Aldehyd in Primärzellen und Geweben auftritt. Dabei war zu klären, ob das Molekül unter Bedingungen des oxidativen Stresses entstehen und auf der Zelloberfläche oder intrazellulär induziert werden kann. Daraus folgernd sollte betrachtet werden, welche neuen immunologischen Therapieansätze zur Behandlung resistenter Tumore unter Nutzung von GD3-7-Aldehyd möglich wären.

Voraussetzungen für die Experimente dieser Arbeit und für nachfolgende Forschungsfragen sind zuverlässige Nachweismöglichkeiten der Metabolite GD3, 9-O-acetyl-GD3 und GD3-7-Aldehyd. Während für den Nachweis von GD3 und 9-O-acetyl-GD3 bereits monoklonale Antikörper zur Verfügung standen, war für die Detektion von GD3-7-Aldehyd im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein monoklonaler Antikörper gegen ein oxidiertes Gangliosid zu generieren und zu charakterisieren. Für die Selektion antikörperproduzierender Zellen musste dafür zunächst eine neue Screeningmethode etabliert werden.

Für die Überprüfung des Bindungsverhaltens der gangliosidspezifischen Antikörper und für die Durchführung der Inkubationsversuche waren die Ganglioside GD3 und 9-O-acetyl-GD3 über mehrere Chromatographieschritte aus lyophilisierter Buttermilch zu isolieren und das oxidierte Derivat herzustellen. Dabei wurde erstmals die Reinigung von GD3-7-Aldehyd mit der HPLC durchgeführt.

Der im Rahmen dieser Arbeit generierte monoklonale Antikörper 10C6 gehört der Immunglobulin-Subklasse IgG2a an und bindet an die oxidierte Form des Gangliosids GD3.

Das von 10C6 erkannte Antigen ist eine Glycankette der Struktur Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal mit oxidierter terminaler Sialinsäure. Der Antikörper reagiert nicht mit reduzierten oder 9-O-acetylierten Gangliosidvarianten und weist eine höhere Sensitivität auf als die etablierten Antikörper zum Nachweis der beiden anderen GD3-Derivate.

In der Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass die oxidative Modifikation von GD3 zu GD3-7-Aldehyd unter Bedingungen des oxidativen Stresses entstehen kann. In der GD3-resistenten Zelllinie Molt-4 induziert die Substanz Apoptose. GD3-7-Aldehyd kommt daher als proapoptotisches Effektormolekül in Frage.

Das von 10C6 erkannte Antigen kommt auf der Oberfläche von Monozyten einzelner Spender vor. Außerdem kann es auf der Oberfläche eines Teils der Blasten bei akuter myeloischer Leukämie gefunden werden. Andere Leukozyten des peripheren Blutes tragen diese Struktur nicht. GD3-7-Aldehyd kommt in den Tumorzelllinien HEp-2, HL60 und T47D vor. In Gewebeschnitten von humanem Mammakarzinom sowie fötaler Milz und fötalem Darm von Primaten fanden sich Hinweise auf Strukturen mit oxidativ modifizierter Sialinsäure, in Geweben adulter Primaten wurden diese nicht gefunden.

Auf der Oberfläche von Melanomzelllinien wie Ma-Mel-11, Ma-Mel-95 und SK-Mel-23 vorkommendes GD3 kann durch Natriumperjodatbehandlung zu GD3-7-Aldehyd oxidiert werden. Durch UV-Bestrahlung kann auf der Oberfläche von HEp-2- und SK-Mel-23-Zellen eine mit dem Antikörper 10C6 detektierbare Struktur induziert werden. HL60-Zellen lassen sich durch extern zugeführten GD3-7-Aldehyd dekorieren, es bleibt auf ihrer Oberfläche bis zu 48 Stunden nachweisbar.

Für einen immunologischen Tumortherapieansatz könnten sowohl das geringe Vorkommen des Antigens in gesunden Geweben als auch die Induzierbarkeit auf der Oberfläche bestimmter Tumorzellen nach lokaler Vorbehandlung sowie die Toxizität der Substanz von Nutzen sein. Ein passender spezifischer Antikörper liegt nun vor.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Detektionssysteme können für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der Glycolipidforschung eingesetzt werden.

Summary

Glycosphingolipids are a group of amphiphatic membrane and structure lipids consisting of one molecule of the aminoalcohol Sphingosin or one of its derivatives, a long chain fatty acid, and a carbohydrate moiety as polar side chain. One subgroup of these substances are gangliosides, which are characterized by sialic acid as a component of their glycan chain.

The ganglioside GD3 is described as tumor associated antigen on the surface of neuroectodermal tumors and as proapoptotic lipid mediator. Its biological functions as well as its mode of operation in the context of apoptosis still remain unclear.

There are hints, that not GD3 itself, but an oxidized derivative represents the actual effector molecule. A minimal change in the GD3 molecule, the 9-O-acetylation of the side chain of the terminal sialic acid, abolishes the proapoptotic effect completely. Tumor cells with activity of the enzyme 9-O-acetyltransferase can escape from apoptosis like that.

The request of this work was to investigate the occurrence and function of this so far solely artificially generated oxidized GD3 derivative. The impact of oxidized GD3 on the survival of GD3-resistant tumor cells had to be analyzed. It had to be examined, whether GD3-7-aldehyde occurs in primary cells and tissues. Withal it was to clarify, if the molecule occurs under conditions of oxidative stress and if it can be induced on the surface of cells or intracellularly. Following that, it was to contemplate which novel approaches of immunological therapies for the treatment of resistant tumors could be possible under the use of GD3-7-aldehyde.

Prerequisite to all experiments of this work and for following research are reliable detection methods of the metabolites GD3, and GD3-7-aldehyde. Whereas for the detection of GD3 and 9-O-acetyl-GD3 monoclonal antibodies were already existing, for the detection of GD3-7-aldehyde a novel monoclonal antibody directed against an oxidized ganglioside had to be generated for the first time and had to be characterized. For the selection of antibody producing cells, a new screening method had to be established.

For the examination of the binding behavior of the ganglioside specific antibodies and for the performance of the incubation assays the gangliosides GD3 and 9-O-acetyl-GD3 had to be isolated from lyophilized bovine buttermilk via several chromatography steps and the oxidized derivative had to be produced. In doing so, GD3-7-al was purified by HPLC for the first time.

The monoclonal antibody 10C6 generated in the framework of this study is member of immunoglobulin subclass IgG2a and binds to the oxidized form of the ganglioside GD3. The antigen detected by 10C6 is a glycan chain with structure Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal with oxidized terminal sialic acid. The antibody does not react with reduced or 9-O-acetylated forms of the ganglioside GD3 and possesses a higher sensitivity than the antibodies, established for the detection of both other GD3 derivatives.

In this work it is shown *in vitro*, that the oxidative modification of GD3 to GD3-7-aldehyde can arise under conditions of oxidative stress. In GD3-resistant Molt-4-cells this substance induces apoptosis. Therefore GD3-7-aldehyde comes into consideration to be a proapoptotic effector molecule.

The antigen detected by 10C6 occurs on the surface of monocytes of particular donors. Further, it can be found on the surface of a portion of the blasts of acute myeloid leukemia. Other leucocytes of the peripheral blood do not show this structure. GD3-7-aldehyde occurs in tumor cell lines HEp-2, HL60, and T47D. Hints for the existence of structures with oxidatively modified sialic acid were found in tissue slides of human mamma carcinoma and fetal gut. In tissues of adult primates this was not the case.

On the surface of melanoma cell lines like Ma-Mel-11, Ma-Mel-95, and SK-Mel-23, existing GD3 can be converted into GD3-7-aldehyde by sodium periodate treatment. UV radiation can induce a structure detectable by 10C6 on the surface of HEp-2- and SK-Mel-23-cells. HL60-cells can be decorated by externally administered GD3-7-aldehyde. It is detectable on their surface for up to 48 hours.

For an immunological approach of tumor therapy, the sparsely incidence of this antigen in healthy tissues as well as the inducibility on the surface of distinct tumor cells after pretreatment and the toxicity of this substance could be advantageous. A fitting antibody is now available.

The detection methods established in the context of this work can be applied for further investigations in glycolipid research.

6 Literaturverzeichnis

Angata T, Varki A. 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: An evolutionary perspective. *Chem Rev* 102:439-469.

Arcangeli A, Toma L, Contiero L, Crociani O, Legnani L, Lunghi C, Nesti E, Moneti G, Richichi B, Nativi C. 2010. Stable GM3 lactone mimetic raises antibodies specific for the antigens expressed on melanoma cells. *Bioconjug Chem* 21:1432-1438.

Ariga T, Suetake K, Nakane M, Kubota M, Usuki S, Kawashima I, Yu RK. 2008. Glycosphingolipid antigens in neural tumor cell lines and anti-glycosphingolipid antibodies in sera of patients with neural tumors. *Neurosignals* 16:226-234.

Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, Peehl DM, Knox SJ. 2002. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 9:252-263.

Azuma Y, Sato H, Higai K, Matsumoto K. 2007. Enhanced expression of membrane-associated sialidase Neu3 decreases GD3 and increases GM3 on the surface of jurkat cells during etoposide-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull* 30:1680-1684.

Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. 2005. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolyneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* 280:4228-4237.

Bartke N, Hannun YA. 2009. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *J Lipid Res* 50 Suppl:S91-6.

Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 196:121-135.

Bergqvist P, Gardby E, Stensson A, Bemark M, Lycke NY. 2006. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J Immunol* 177:7772-7783.

Bethke U, Muthing J, Schauder B, Conradt P, Muhlradt PF. 1986. An improved semi-quantitative enzyme immunostaining procedure for glycosphingolipid antigens on high performance thin layer chromatograms. *J Immunol Methods* 89:111-116.

Birks SM, Danquah JO, King L, Vlasak R, Gorecki DC, Pilkington GJ. 2011. Targeting the GD3 acetylation pathway selectively induces apoptosis in glioblastoma. *Neuro Oncol* 13:950-960.

Biswas S, Biswas K, Richmond A, Ko J, Ghosh S, Simmons M, Rayman P, Rini B, Gill I, Tannenbaum CS, Finke JH. 2009. Elevated levels of select gangliosides in T cells from renal cell carcinoma patients is associated with T cell dysfunction. *J Immunol* 183:5050-5058.

BLIX FG, GOTTSCHALK A, KLENK E. 1957. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179:1088.

Blum AS, Barnstable CJ. 1987. O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8716-8720.

- Brenner C, Kniep B, Maillier E, Martel C, Franke C, Rober N, Bachmann M, Rieber EP, Sandhoff R. 2010. GD3-7-aldehyde is an apoptosis inducer and interacts with adenine nucleotide translocase. *Biochem Biophys Res Commun* 391:248-253.
- Carubia JM, Yu RK, Macala LJ, Kirkwood JM, Varga JM. 1984. Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 120:500-504.
- Chefalo P, Pan Y, Nagy N, Guo Z, Harding CV. 2006. Efficient metabolic engineering of GM3 on tumor cells by N-phenylacetyl-D-mannosamine. *Biochemistry* 45:3733-3739.
- Chen HY, Varki A. 2002. O-acetylation of GD3: An enigmatic modification regulating apoptosis? *J Exp Med* 196:1529-1533.
- Cheresh DA, Harper JR, Schulz G, Reisfeld RA. 1984. Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:5767-5771.
- Cheresh DA, Honsik CJ, Staffileno LK, Jung G, Reisfeld RA. 1985. Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5155-5159.
- Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. 1986. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol* 102:688-696.
- Cheresh DA, Varki AP, Varki NM, Stallcup WB, Levine J, Reisfeld RA. 1984. A monoclonal antibody recognizes an O-acetylated sialic acid in a human melanoma-associated ganglioside. *J Biol Chem* 259:7453-7459.
- Chester MA. IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN). nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. - *Eur J Biochem*.1998 Oct 15;257(2):293-8. .
- Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A. 1998. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the homo-pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11751-11756.
- Colell A, Garcia-Ruiz C, Mari M, Fernandez-Checa JC. 2004. Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. *FEBS Lett* 560:63-68.
- Colell A, Garcia-Ruiz C, Roman J, Ballesta A, Fernandez-Checa JC. 2001. Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway. *FASEB J* 15:1068-1070.
- Colley KJ. Golgi localization of glycosyltransferases: More questions than answers. - *Glycobiology*.1997 Feb;7(1):1-13. .
- Corfield AP, Corfield CD, Veh RW, Wagner SA, Clamp JR, Schauer R. 1991. Characterization of the major and minor mucus glycoproteins from bovine submandibular gland. *Glycoconj J* 8:330-339.
- Crespo PM, Torres Demichelis V, Daniotti JL. Neobiosynthesis of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycosyltransferases. - *J Biol Chem*.2010 Jul 16. .

- Daniotti JL, Iglesias-Bartolome R. 2011. Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides. *IUBMB Life* 63:513-520.
- de Boer M, Kasran A, Kwekkeboom J, Walter H, Vandenberghe P, Ceuppens JL. 1993. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol* 23:3120-3125.
- De Maria R, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomassini B, Zeuner A, Rippo MR, Testi R. 1997. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277:1652-1655.
- Diatlovitskaia EV, Tekieva EA, Lemenovskaia AF, Somova OG, Bergel'son LD. 1991. Gangliosides GM3 and GD3 in human stomach and breast tumors. *Biokhimiia* 56:560-564.
- Dippold WG, Dienes HP, Knuth A, Meyer zum Buschenfelde KH. 1985. Immunohistochemical localization of ganglioside GD3 in human malignant melanoma, epithelial tumors, and normal tissues. *Cancer Res* 45:3699-3705.
- Dippold WG, Knuth A, Meyer zum Buschenfelde KH. 1984. Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal anti-GD3-ganglioside antibody. *Cancer Res* 44:806-810.
- Duchemin AM, Ren Q, Neff NH, Hadjiconstantinou M. 2008. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: Involvement of trk receptors. *J Neurochem* 104:1466-1477.
- Eckhardt M. 2008. The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 37:93-103.
- English D, Andersen BR. 1974. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of ficoll-hypaque. *J Immunol Methods* 5:249-252.
- Fisher M, Levine PH, Cohen RA. 1990. A 21-aminosteroid reduces hydrogen peroxide generation by and chemiluminescence of stimulated human leukocytes. *Stroke* 21:1435-1438.
- Fomina-Ageeva EV, Diatlovitskaia EV, Lemenovskaia AF, Bergel'son LD. 1987. Glycosphingolipids from human T-lymphoma MOLT-4 cells. *Biokhimiia* 52:1777-1780.
- Freimer ML, McIntosh K, Adams RA, Alving CR, Drachman DB. 1993. Gangliosides elicit a T-cell independent antibody response. *J Autoimmun* 6:281-289.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. - *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jun 6. .
- Fukuda MN, Dell A, Oates JE, Wu P, Klock JC, Fukuda M. 1985. Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. the presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. *J Biol Chem* 260:1067-1082.
- Gabri MR, Otero LL, Gomez DE, Alonso DF. 2009. Exogenous incorporation of neugc-rich mucin augments n-glycolyl sialic acid content and promotes malignant phenotype in mouse tumor cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 28:146-9966-28-146.

- Gahmberg CG, Andersson LC. 1977. Selective radioactive labeling of cell surface sialoglycoproteins by periodate-tritiated borohydride. *J Biol Chem* 252:5888-5894.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. 2002. Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 277:36443-36448.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernandez-Checa JC. 2000. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *Faseb j* 14:847-858.
- Garofalo T, Tinari A, Matarrese P, Giammarioli AM, Manganeli V, Ciarlo L, Misasi R, Sorice M, Malorni W. 2007. Do mitochondria act as "cargo boats" in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis? *FEBS Lett* 581:3899-3903.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13:1423-1433.
- Granger DN, Korthuis RJ. 1995. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 57:311-332.
- Grimm MO, Zinser EG, Groschen S, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, Burg VK, Kaestner L, Bayer TA, Lipp P, Muller U, Grimm HS, Hartmann T. 2012. Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* 7:e34095.
- Guidry TV, Hunter RL, Jr, Actor JK. 2007. Mycobacterial glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate-induced hypersensitive granulomas: Contribution of CD4⁺ lymphocytes. *Microbiology* 153:3360-3369.
- Hakomori S, Igarashi Y. 1995. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* 118:1091-1103.
- Halestrap AP. 2010. A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38:841-860.
- Hamamura K, Furukawa K, Hayashi T, Hattori T, Nakano J, Nakashima H, Okuda T, Mizutani H, Hattori H, Ueda M, Urano T, Lloyd KO, Furukawa K. 2005. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11041-11046.
- Hamamura K, Tsuji M, Ohkawa Y, Nakashima H, Miyazaki S, Urano T, Yamamoto N, Ueda M, Furukawa K, Furukawa K. 2008. Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1780:513-519.
- Hanai N, Dohi T, Nores GA, Hakomori S. 1988. A novel ganglioside, de-N-acetyl-GM3 (II3NeuNH₂LacCer), acting as a strong promoter for epidermal growth factor receptor kinase and as a stimulator for cell growth. *J Biol Chem* 263:6296-6301.
- He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26:812-826.

- HECKNER F, STRUFE R. 1956. Cytochemical demonstration of polysaccharides with sodium periodate. *Klin Wochenschr* 34:326-329.
- Hedberg KM, Dellheden B, Wikstrand CJ, Fredman P. 2000. Monoclonal anti-GD3 antibodies selectively inhibit the proliferation of human malignant glioma cells in vitro. *Glycoconj J* 17:717-726.
- Heidenheim M, Hansen ER, Baadsgaard O. 1995. CDW60, which identifies the acetylated form of GD3 gangliosides, is strongly expressed in human basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 133:392-397.
- Hellstrom I, Brankovan V, Hellstrom KE. 1985. Strong antitumor activities of IgG3 antibodies to a human melanoma-associated ganglioside. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1499-1502.
- Hersey P, Jamal O, Henderson C, Zardawi I, D'Alessandro G. 1988. Expression of the gangliosides GM3, GD3 and GD2 in tissue sections of normal skin, naevi, primary and metastatic melanoma. *Int J Cancer* 41:336-343.
- Higuchi Y, Miura T, Kajimoto T, Ohta Y. 2005. Effects of disialoganglioside GD3 on the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 579:3009-3013.
- Hirno S, Kelm S, Schauer R, Nilsson B, Wadstrom T. 1996. Adhesion of helicobacter pylori strains to alpha-2,3-linked sialic acids. *Glycoconj J* 13:1005-1011.
- Honsik CJ, Jung G, Reisfeld RA. 1986. Lymphokine-activated killer cells targeted by monoclonal antibodies to the disialogangliosides GD2 and GD3 specifically lyse human tumor cells of neuroectodermal origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7893-7897.
- Ichikawa S, Hirabayashi Y. 1998. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 8:198-202.
- Iglesias-Bartolome R, Crespo PM, Gomez GA, Daniotti JL. 2006. The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. inhibitory effect of brefeldin A and monensin. *Febs j* 273:1744-1758.
- Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, Van Laethem F, Goldman M, Dubois PM. 2002. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* 168:926-932.
- Jacobs CL, Goon S, Yarema KJ, Hinderlich S, Hang HC, Chai DH, Bertozzi CR. 2001. Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry* 40:12864-12874.
- Jones DA, Smith CW, McIntire LV. 1996. Leucocyte adhesion under flow conditions: Principles important in tissue engineering. *Biomaterials* 17:337-347.
- Kamerling JP, Vliegenthart JF. 1975. Identification of O-cetylated N-acylneuraminic acids by mass spectrometry. *Carbohydr Res* 41:7-17.
- Keenan TW. Composition and synthesis of gangliosides in mammary gland and milk of the bovine. - *Biochim Biophys Acta*.1974 Feb 25;337(2):255-70. .

Kemminer SE, Conradt HS, Nimtz M, Sagi D, Peter-Katalinic J, Diekmann O, Drmic I, Muthing J. 2001. Production and molecular characterization of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol Prog* 17:809-821.

Kim JK, Kim SH, Cho HY, Shin HS, Sung HR, Jung JR, Quan ML, Jiang DH, Bae HR. 2010. GD3 accumulation in cell surface lipid rafts prior to mitochondrial targeting contributes to amyloid-beta-induced apoptosis. *J Korean Med Sci* 25:1492-1498.

Kitajima K, Inoue S. 1992. KDN: A novel sialic acid analogue. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 37:1976-1981.

KLENK E, LAUENSTEIN K. 1951. Carbohydrate containing lipids of the formed elements of the human blood. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 288:220-228.

Kniep B, Claus C, Peter-Katalinic J, Monner DA, Dippold W, Nimtz M. 1995. 7-O-acetyl-GD3 in human T-lymphocytes is detected by a specific T-cell-activating monoclonal antibody. *J Biol Chem* 270:30173-30180.

Kniep B, Flegel WA, Northoff H, Rieber EP. 1993. CDw60 glycolipid antigens of human leukocytes: Structural characterization and cellular distribution. *Blood* 82:1776-1786.

Kniep B, Kniep E, Ozkucur N, Barz S, Bachmann M, Malisan F, Testi R, Rieber EP. 2006. 9-O-acetyl GD3 protects tumor cells from apoptosis. *Int J Cancer* 119:67-73.

Kok JW, Babia T, Hoekstra D. 1991. Sorting of sphingolipids in the endocytic pathway of HT29 cells. *J Cell Biol* 114:231-239.

Kolter T, Proia RL, Sandhoff K. 2002. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* 277:25859-25862.

Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. 1996. Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett* 102:209-215.

Koppenol WH. The centennial of the fenton reaction. - *Free Radic Biol Med*.1993 Dec;15(6):645-51. -FentonHJFSFentonHJEDAT-1993/12/01MHDA-1993/12/0100:01RDT-1993/12/0100:00STubsh.

Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH. 2006. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med* 41:549-556.

Kurien BT, Scofield RH. 2008. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev* 7:567-573.

Lannert H, Gorgas K, Meissner I, Wieland FT, Jeckel D. 1998. Functional organization of the golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late golgi. *J Biol Chem* 273:2939-2946.

Lee JC, Son YO, Choi KC, Jang YS. 2006. Hydrogen peroxide induces apoptosis of BJAB cells due to formation of hydroxyl radicals via intracellular iron-mediated fenton chemistry in glucose oxidase-mediated oxidative stress. *Mol Cells* 22:21-29.

Lindhorst TK. Synthesis in the glycosciences. - *Beilstein J Org Chem*.2010 Feb 22;6:16. .

- Lindhorst TK. 2000. Struktur und funktion von kohlenhydraten. *Chemie in Unserer Zeit* 34:38-52.
- Livingston PO, Ritter G, Calves MJ. 1989. Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2 and GD3 in the mouse. *Cancer Immunol Immunother* 29:179-184.
- Lo AS, Ma Q, Liu DL, Junghans RP. 2010. Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res* 16:2769-2780.
- Maccioni HJ, Daniotti JL, Martina JA. 1999. Organization of ganglioside synthesis in the golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1437:101-118.
- Maguire HC,Jr, Berd D, Lattime EC, McCue PA, Kim S, Chapman PB, Mastrangelo MJ. 1998. Phase I study of R24 in patients with metastatic melanoma including evaluation of immunologic parameters. *Cancer Biother Radiopharm* 13:13-23.
- Makino Y, Hamamura K, Takei Y, Bhuiyan RH, Ohkawa Y, Ohmi Y, Nakashima H, Furukawa K, Furukawa K. 2016. A therapeutic trial of human melanomas with combined small interfering RNAs targeting adaptor molecules p130Cas and paxillin activated under expression of ganglioside GD3. *Biochim Biophys Acta* 1860:1753-1763.
- Malisan F, Franchi L, Tomassini B, Ventura N, Condo I, Rippo MR, Rufini A, Liberati L, Nachtigall C, Kniep B, Testi R. 2002. Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J Exp Med* 196:1535-1541.
- Malisan F, Testi R. 2002. GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:179-187.
- Manzi AE, Sjoberg ER, Diaz S, Varki A. 1990. Biosynthesis and turnover of O-acetyl and N-acetyl groups in the gangliosides of human melanoma cells. *J Biol Chem* 265:13091-13103.
- Marconi S, De Toni L, Lovato L, Tedeschi E, Gaetti L, Acler M, Bonetti B. 2005. Expression of gangliosides on glial and neuronal cells in normal and pathological adult human brain. *J Neuroimmunol* 170:115-121.
- Marsh BJ, Mastronarde DN, Buttle KF, Howell KE, McIntosh JR. 2001. Organellar relationships in the golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2399-2406.
- Martin MJ, Rayner JC, Gagneux P, Barnwell JW, Varki A. 2005. Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: Relationship to human genetic loss of N-glycolylneuraminic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12819-12824.
- Mazurov VV, Solovieva ME, Leshchenko VV, Kruglov AG, Edelweiss EF, Yakubovskaya RI, Akatov VS. 2003. Small heat shock protein hsp27 as a possible mediator of intercellular adhesion-induced drug resistance in human larynx carcinoma HEp-2 cells. *Biosci Rep* 23:187-197.
- McJarrow P, Schnell N, Jumpsen J, Clandinin T. 2009. Influence of dietary gangliosides on neonatal brain development. *Nutr Rev* 67:451-463.

- Mehta S, Chhetra R, Srinivasan R, Sharma SC, Behera D, Ghosh S. 2010. Detection of disease specific sialoglycoconjugate specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluid of non-small cell lung cancer patients. *Glycoconj J* 27:491-500.
- Merrill AH, Jr, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA, Wang E. 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: Biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:208-225.
- Merritt WD, Casper JT, Lauer SJ, Reaman GH. 1987. Expression of GD3 ganglioside in childhood T-cell lymphoblastic malignancies. *Cancer Res* 47:1724-1730.
- Merritt WD, Taylor BJ, Der-Minassian V, Reaman GH. 1996. Coexpression of GD3 ganglioside with CD45RO in resting and activated human T lymphocytes. *Cell Immunol* 173:131-148.
- Miwa Y, Kobayashi T, Nagasaka T, Liu D, Yu M, Yokoyama I, Suzuki A, Nakao A. 2004. Are N-glycolylneuraminic acid (hanganutziu-deicher) antigens important in pig-to-human xenotransplantation? *Xenotransplantation* 11:247-253.
- Mukherjee K, Chowdhury S, Mondal S, Mandal C, Chandra S, Bhadra RK, Mandal C. 2007. 9-O-acetylated GD3 triggers programmed cell death in mature erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 362:651-657.
- Murray MC, Bhavanandan VP, Davidson EA, Reinhold V. 1989. Modification of sialyl residues of glycoconjugates by reductive amination. characterization of the modified sialic acids. *Carbohydr Res* 186:255-265.
- Nakatani Y, Yanagisawa M, Suzuki Y, Yu RK. 2010. Characterization of GD3 ganglioside as a novel biomarker of mouse neural stem cells. *Glycobiology* 20:78-86.
- Navid F, Santana VM, Barfield RC. 2010. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 10:200-209.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-279.
- Nojiri H, Takaku F, Ohta M, Miura Y, Saito M. 1985. Changes in glycosphingolipid composition during differentiation of human leukemic granulocytes in chronic myelogenous leukemia compared with in vitro granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Res* 45:6100-6106.
- Oetke C, Hinderlich S, Brossmer R, Reutter W, Pawlita M, Keppler OT. 2001. Evidence for efficient uptake and incorporation of sialic acid by eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 268:4553-4561.
- Ohkawa Y, Miyazaki S, Hamamura K, Kambe M, Miyata M, Tajima O, Ohmi Y, Yamauchi Y, Furukawa K, Furukawa K. Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. - *J Biol Chem*.2010 Jun 25. .
- Paris R, Morales A, Coll O, Sanchez-Reyes A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. 2002. Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy. *J Biol Chem* 277:49870-49876.

- Park JE, Lu SX, Wu DY, Prendes M, Chapman PB. 2008. Antibody response to GD3 ganglioside is independent of NKT cells. *Cytotherapy* 10:38-44.
- Popa I, Pons A, Mariller C, Tai T, Zanetta JP, Thomas L, Portoukalian J. 2007. Purification and structural characterization of de-N-acetylated form of GD3 ganglioside present in human melanoma tumors. *Glycobiology* 17:367-373.
- Posse de Chaves E, Sipione S. 2010. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett* 584:1748-1759.
- Pukel CS, Lloyd KO, Travassos LR, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ. 1982. GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med* 155:1133-1147.
- Ravindranath MH, Morton DL, Irie RF. 1989. An epitope common to gangliosides O-acetyl-GD3 and GD3 recognized by antibodies in melanoma patients after active specific immunotherapy. *Cancer Res* 49:3891-3897.
- Ren S, Kambe N, Du Z, Li Y, Xia HZ, Kambe M, Bieberich E, Pozez A, Grimes M, Yu RK, Irani AM, Schwartz LB. 2001. Disialoganglioside GD3 is selectively expressed by developing and mature human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 107:322-330.
- Ren S, Scarsdale JN, Ariga T, Zhang Y, Klein RA, Hartmann R, Kushi Y, Egge H, Yu RK. 1992. O-acetylated gangliosides in bovine buttermilk. characterization of 7-O-acetyl, 9-O-acetyl, and 7,9-di-O-acetyl GD3. *J Biol Chem* 267:12632-12638.
- Reuter G, Schauer R. 1994. Determination of sialic acids. *Methods Enzymol* 230:168-199.
- Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, Takang EE, Diffo JL, Pike BL, Rosenthal BM, Formenty P, Boesch C, Ayala FJ, Wolfe ND. 2009. The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14902-14907.
- Rippo MR, Malisan F, Ravagnan L, Tomassini B, Condo I, Costantini P, Susin SA, Rufini A, Todaro M, Kroemer G, Testi R. 2000. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *Faseb j* 14:2047-2054.
- Ritter G, Boosfeld E, Calves MJ, Oettgen HF, Old LJ, Livingston PO. 1990. Antibody response to immunization with purified GD3 ganglioside and GD3 derivatives (lactones, amide and gangliosidol) in the mouse. *Immunobiology* 182:32-43.
- Rueda R. The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. - *Br J Nutr.* 2007 Oct;98 Suppl 1:S68-73. .
- Sa G, Das T, Moon C, Hilston CM, Rayman PA, Rini BI, Tannenbaum CS, Finke JH. 2009. GD3, an overexpressed tumor-derived ganglioside, mediates the apoptosis of activated but not resting T cells. *Cancer Res* 69:3095-3104.
- Schakel K, Mayer E, Federle C, Schmitz M, Riethmuller G, Rieber EP. 1998. A novel dendritic cell population in human blood: One-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:4084-4093.
- Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. - *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct;19(5):507-14. Epub 2009 Aug 19. .

- Schuette CG, Doering T, Kolter T, Sandhoff K. 1999. The glycosphingolipidoses-from disease to basic principles of metabolism. *Biol Chem* 380:759-766.
- Schulze A. 2008. Nachweis einer 9-O-acetyltransferase in humanen leukämiezellenInstitut für Immunologie, Medizinische Fakultät "Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Sjoberg ER, Chammas R, Ozawa H, Kawashima I, Khoo KH, Morris HR, Dell A, Tai T, Varki A. 1995. Expression of de-N-acetyl-gangliosides in human melanoma cells is induced by genistein or nocodazole. *J Biol Chem* 270:2921-2930.
- Spichtig V, Michaud J, Austin S. 2010. Determination of sialic acids in milks and milk-based products. *Anal Biochem* 405:28-40.
- Suzuki Y, Hirabayashi Y, Matsumoto N, Kato H, Hidari K, Tsuchiya K, Matsumoto M, Hoshino H, Tozawa H, Miwa M. 1987. Aberrant expression of ganglioside and asialoglycosphingolipid antigens in adult T-cell leukemia cells. *Jpn J Cancer Res* 78:1112-1120.
- Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. - *J Neurochem.*1963 Sep;10:613-23. .
- Tai T, Kawashima I, Furukawa K, Lloyd KO. 1988. Monoclonal antibody R24 distinguishes between different N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid derivatives of ganglioside GD3. *Arch Biochem Biophys* 260:51-55.
- Takamizawa K, Iwamori M, Mutai M, Nagai Y. 1986. Gangliosides of bovine buttermilk. isolation and characterization of a novel monosialoganglioside with a new branching structure. *J Biol Chem* 261:5625-5630.
- Tempera I, Buchetti B, Lococo E, Gradini R, Mastronardi A, Mascellino MT, Sale P, Mosca L, d'Erme M, Lenti L. 2008. GD3 nuclear localization after apoptosis induction in HUT-78 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368:495-500.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-28.
- Torres Demichelis V, Vilcaes AA, Iglesias-Bartolome R, Ruggiero FM, Daniotti JL. 2013. Targeted delivery of immunotoxin by antibody to ganglioside GD3: A novel drug delivery route for tumor cells. *PLoS One* 8:e55304.
- Triozi PL, Shah JJ, Wang WQ, Aldrich W, Edberg JC, Su K, Carlisle R, Conry R, LoBuglio AF, Forero A. 2006. Anti-GD3 monoclonal antibody effects on lymphocytes and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Biother Radiopharm* 21:553-560.
- Tsuchida T, Ravindranath MH, Saxton RE, Irie RF. 1987. Gangliosides of human melanoma: Altered expression in vivo and in vitro. *Cancer Res* 47:1278-1281.
- Vadhan-Raj S, Cordon-Cardo C, Carswell E, Mintzer D, Dantis L, Duteau C, Templeton MA, Oettgen HF, Old LJ, Houghton AN. 1988. Phase I trial of a mouse monoclonal antibody against GD3 ganglioside in patients with melanoma: Induction of inflammatory responses at tumor sites. *J Clin Oncol* 6:1636-1648.

- van Echten-Deckert G, Herget T. 2006. Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim Biophys Acta* 1758:1978-1994.
- Van Lenten L, Ashwell G. 1971. Studies on the chemical and enzymatic modification of glycoproteins. A general method for the tritiation of sialic acid-containing glycoproteins. *J Biol Chem* 246:1889-1894.
- van Meer G, Lisman Q. 2002. Sphingolipid transport: Rafts and translocators. *J Biol Chem* 277:25855-25858.
- Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. - *Glycoconj J*.2009 Apr;26(3):231-45.Epub 2008 Sep 7. .
- Varki A. 2001. N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie* 83:615-622.
- Vilcaes AA, Demichelis VT, Daniotti JL. 2011. Trans-activity of plasma membrane-associated ganglioside sialyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* 286:31437-31446.
- Wada A, Hasegawa M, Wong PF, Shirai E, Shirai N, Tan LJ, Llanes R, Hojo H, Yamasaki E, Ichinose A, Ichinose Y, Senba M. 2010. Direct binding of gangliosides to helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity. *Glycobiology* 20:668-678.
- Warnock DE, Lutz MS, Blackburn WA, Young WW,Jr, Baenziger JU. 1994. Transport of newly synthesized glucosylceramide to the plasma membrane by a non-golgi pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2708-2712.
- Watarai S, Onuma M, Yasuda T. 1991. Production of monoclonal antibodies specific for ganglioside GD3. *J Biochem* 110:889-895.
- Webb TJ, Li X, Giuntoli RL,2nd, Lopez PH, Heuser C, Schnaar RL, Tsuji M, Kurts C, Oelke M, Schneck JP. 2012. Molecular identification of GD3 as a suppressor of the innate immune response in ovarian cancer. *Cancer Res* 72:3744-3752.
- Wipfler D, Srinivasan GV, Sadick H, Kniep B, Arming S, Willhauck-Fleckenstein M, Vlasak R, Schauer R, Schwartz-Albiez R. 2011. Differentially regulated expression of 9-O-acetyl GD3 (CD60b) and 7-O-acetyl-GD3 (CD60c) during differentiation and maturation of human T and B lymphocytes. *Glycobiology* 21:1161-1172.
- Yamaji T, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K. 2008. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* 60:511-518.
- Yamakawa T. A reflection on the early history of glycosphingolipids. - *Glycoconj J*.1996 Apr;13(2):123-6. .
- Yanagisawa M, Yoshimura S, Yu RK. 2011. Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells. *ASN Neuro* 3:10.1042/AN20110006.
- Yuki N. Human gangliosides and bacterial lipo-oligosaccharides in the development of autoimmune neuropathies. - *Methods Mol Biol*.2010;600:51-65. .
- Yuki N, Odaka M. 2005. Ganglioside mimicry as a cause of guillain-barre syndrome. *Curr Opin Neurol* 18:557-561.

Zeng G, Gao L, Birkle S, Yu RK. 2000. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res* 60:6670-6676.

Zhao S, Yang YN, Song JG. 2004. Ceramide induces caspase-dependent and -independent apoptosis in A-431 cells. *J Cell Physiol* 199:47-56.

Zou W, Borrelli S, Gilbert M, Liu T, Pon RA, Jennings HJ. 2004. Bioengineering of surface GD3 ganglioside for immunotargeting human melanoma cells. *J Biol Chem* 279:25390-25399.

Anhang

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose induzierender Faktor
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANT	<i>Adenin nucleotid translocase</i> engl.
ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i> engl.
ATCC	<i>American Type Tissue Collection</i> engl.
aSMase	Saure Sphingomyelinase (<i>Acidic Sphingomyelinase</i> engl.)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
Cer	Ceramid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> engl.
CMC	Komplementvermittelte Zytotoxizität (<i>Complement Mediated Cytotoxicity</i> engl.)
Cyp D	<i>Cyclophilin D</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DCFDA	5-(und 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i> eng.)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> engl.
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> engl.
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i> engl.)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetyl-Galactosamin

Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylceramid
GlcNAc	N-acetyl-Glucosamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor
GSL	Glycosphingolipide
GD3-7-al	GD3-7-Aldehyd
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GGT	Glycolipidglycosyltransferasen
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> engl.
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> engl.
HT	Hypoxanthin-Thymidin
IL	Interleukin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Lac	Lactose
LacCer	Lactosylceramid
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>Monoclonal Antibody</i> engl.)
MFI	Mittlerer Fluoreszenzindex
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
Mo-DCs	<i>Monocyte Derived Dendritic Cells</i> engl.
MPL	Monophosphoryl Lipid A
n.e.	nicht ermittelt
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NGF	Nerven Wachstumsfaktor (<i>Nerve Growth Factor</i> engl.)
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
9-O-acGD3	9-O-acetyl-GD3
OKT3	Orthoclone OKT3 [®] (Muromonab-CD3)
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> engl.
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PTPC	Permeabilisierungs-Transitions-Poren-Komplex
RP-	Umkehrphase- (<i>Reversed Phase-</i> engl.)
rpm	<i>rotation per minute</i> engl.

RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Medium für die Zellkultur)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> engl.
SCF	Stammzellfaktor
TDM	Trehalose 6,6'-dimycolat
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VDAC	Spannungsabhängiger Anionenkanal (<i>Voltage dependent anion channel</i> engl.)
VEGF	Vaskulärer Endothelwachstumsfaktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> engl.)

Abbildungen

Abbildung 1.1: Grundstruktur der Glycosphingolipide	1
Abbildung 1.2: Lokalisation der Metabolite und Enzyme des Sphingolipidstoffwechsels in den Zellkompartimenten.....	6
Abbildung 1.3: Schema der Biosynthesewege der Ganglioside der 0-, a-, b-, und c-Serie...	7
Abbildung 1.4: Strukturen der beiden häufigsten Sialinsäuren N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Glycolyl-Neuraminsäure	14
Abbildung 1.5: Veränderungen an der terminalen N-Acetylneuraminsäure von GD3 bei der Oxidation mit Natriumperjodat.....	26
Abbildung 2.1: Fließschema der Herstellung von Gangliosiden aus lyophilisierter Buttermilch.....	48
Abbildung 2.2: Fließschema der Herstellung von GD3-7-al aus GD3	52
Abbildung 3.1: HPTLC der Fraktionen der Kieselgelchromatographie gefärbt mit Orcin.	66
Abbildung 3.2: HPTLC der Fraktionen der DEAE-Ionenaustauschchromatographie gefärbt mit Orcin.	67
Abbildung 3.3: HPTLC der GD3-haltigen Fraktionen der HPLC gefärbt mit Orcin.....	68
Abbildung 3.4: HPTLC der GD3-haltigen Sammelprobe aus den HPLC-Fraktionen 108 - 115 für die Quantifizierung gefärbt mit Orcin.	69
Abbildung 3.5: HPTLC der 9-O-acGD3-haltigen Fraktionen der DEAE - Ionenaustausch- chromatographie gefärbt mit Orcin.....	70
Abbildung 3.6: HPTLC der 9-O-acGD3-haltigen Sammelproben für die Quantifizierung gefärbt mit Orcin.	71
Abbildung 3.7: HPTLC der GD3-7-Aldehyd-Sammelproben für die Quantifizierung gefärbt mit Orcin.	72
Abbildung 3.8: Test der Reaktivität der Mausseren auf HPTLC mit GD3-7-al und GD3 in Overlaytechnik.	73
Abbildung 3.9: Test der Reaktivitäten des Serums der Maus 3 auf einem modifizierten kommerziellen Teststreifen zur Detektion von Gangliosidantikörpern.....	74
Abbildung 3.10: Chromatographie und Orcinfärbung der Glycolipide humaner Hirnganglioside, der Disialopolylactosaminylceramide aus Leukozyten und des GD3-Standards für die Testung der Reaktivitäten der Hybridomüberstände.....	78
Abbildung 3.11: Test der Reaktivitäten der Hybridomüberstände der generierten Zellklone auf humane Hirnganglioside und Disialopolylactosaminylceramide in Overlaytechnik nach Oxidation in situ.	79

Abbildung 3.12: Test der Reaktivitäten der Hybridomüberstände der generierten Zellklone auf humane Hirnganglioside und Disialopolylactosaminylceramide in Overlaytechnik.	79
Abbildung 3.13: Spezifität des Überstands des Klons 10C6 getestet auf HPTLC.	80
Abbildung 3.14: Strukturen der vom monoklonalen Antikörper 10C6 detektierten Ganglioside.	81
Abbildung 3.15: Overlay-Färbung auf HPTLC mit dem GD3-spezifischen Antikörper R24.	82
Abbildung 3.16: Densitometrischer Scan der mit R24 inkubierten Platte.	82
Abbildung 3.17: Overlay-Färbung auf HPTLC mit dem 9-O-acGD3-spezifischen Antikörper M-T6004.	83
Abbildung 3.18: Densitometrischer Scan der mit M-T6004 inkubierten Platte.	83
Abbildung 3.19: Overlay-Färbung auf HPTLC mit dem GD3-7-al-spezifischen Antikörper 10C6.	84
Abbildung 3.20: Densitometrischer Scan der mit 10C6 inkubierten Platte.	84
Abbildung 3.21: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen.	85
Abbildung 3.22: Durchflusszytometrische Bestimmung der Ausprägung von GD3 und 9-O-acGD3 auf der Oberfläche von Molt-4-Zellen.	86
Abbildung 3.23: Apoptoseraten von Molt-4-Zellen nach Inkubation mit GD3 und seinen Derivaten.	87
Abbildung 3.24: HPTLC des Produktes der in vitro Oxidation von GD3 mit ROS gefärbt mit 10C6 in Overlaytechnik.	88
Abbildung 3.25: Negatives Ergebnisse bei der Indirekten Immunfluoreszenz an Lebergewebe (Primat).	89
Abbildung 3.26: Stark positives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz an Pankreasgewebe (Primat) bei Färbung mit R24 (anti-GD3).	90
Abbildung 3.27: Positives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz an fötalem Darmgewebe (Primat) bei Färbung mit R24 (anti-GD3) sowie schwache Fluoreszenz bei Färbung mit GD3-7-al (anti-GD3).	90
Abbildung 3.28: Immunhistochemische Färbung von humanem Dünndarm, Colon und SK-Mel-23-Zellen.	92
Abbildung 3.29: Nachweis der GD3-Derivate im chromatographisch aufgetrennten Lipidextrakt von Zelllinien.	94
Abbildung 3.30: Positives Ergebnis bei der Indirekten Immunfluoreszenz am Gewebeschnitt eines Mammakarzinoms bei Färbung mit R24 (anti-GD3) sowie schwache Fluoreszenz bei Färbung mit GD3-7-al (anti-GD3).	96

Abbildung 3.31: Untersuchung des Lipidextraktes von peripheren mononukleären Blutzellen zweier Spender auf HPTLC in Overlaytechnik.	97
Abbildung 3.32: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an der Oberfläche peripherer mononukleärer Blutzellen am Beispiel eines positiven Spenders.	98
Abbildung 3.33: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an der Oberfläche von slan-DCs.	100
Abbildung 3.34: Durchflusszytometrische Messung der Marker CD14, CD83 und CD86 von Monozyten von Spender 3 im Vergleich zu den daraus gewonnenen muren Mo-DCs.	101
Abbildung 3.35: Durchflusszytometrische Messung der Ganglioside GD3, 9-O-acGD3 sowie GD3-7-al auf der Oberfläche von muren Mo-DCs von Spender 3.	102
Abbildung 3.36: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an der Oberfläche von Granulozyten.	103
Abbildung 3.37: Negatives Ergebnis für die Bindung der Antikörper R24, M-T6004 und 10C6 bei der Indirekten Immunfluoreszenz an Granulozyten.	104
Abbildung 3.38: Anteil der mit R24 (anti-GD3) und 10C6 (anti-GD3-7-al) anfärbbaren AML-Blasten.	105
Abbildung 3.39: Anteil der mit 10C6 (anti-GD3-7-al) anfärbbaren AML-Blasten des Patienten C nach radioaktiver Bestrahlung der Zellen und nach Behandlung der Zellen. mit H ₂ O ₂	107
Abbildung 3.40: Färbung verschiedener Zelllinien mit dem Antikörper 10C6 ohne (schwarzer Graph) und mit Natriumperjodatbehandlung (grauer Graph).	109
Abbildung 3.41: Durchflusszytometrische Untersuchung der Ausprägung von GD3-7-al auf der Zelloberfläche von Hep-2-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies und der Apoptoserate.	110
Abbildung 3.42: Untersuchung des Lipidextraktes von HEp-2-Zellen auf HPTLC in Overlaytechnik.	111
Abbildung 3.43: Durchflusszytometrische Untersuchung der Ausprägung von GD3-7-al auf der Zelloberfläche von SK-Mel-23-Zellen in Abhängigkeit vom Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies und der Apoptoserate.	112
Abbildung 3.44: Indirekte Immunfluoreszenz der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen.	114
Abbildung 3.45: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen im Verlauf von 72h bei Verbleib in GD3-7-al-haltigem Medium.	115

Abbildung 3.46: Durchflusszytometrische Messung der Bindung des Antikörpers 10C6 an mit GD3-7-al vorbehandelten HL60-Zellen im Verlauf von 72h in Medium ohne GD3-7-al.	116
--	-----

Tabellen

Tabelle 1.1: Die häufigsten Kohlenhydratsequenzen als Strukturfamilien nach IUPAC.....	3
Tabelle 1.2: Einige Beispiele der beiden Benennungen; modifiziert nach Chester, 1998	4
Tabelle 2.1: Übersicht der eingesetzten Zelllinien.....	28
Tabelle 2.3: Übersicht der Reagenzien, Antikörper und Enzyme	29
Tabelle 2.4: Übersicht der eingesetzten Chemikalien	31
Tabelle 2.5: Übersicht der Geräte und Hilfsmittel.....	32
Tabelle 3.1: Isotypen der GD3-7-al spezifischen Antikörper unterschiedlicher Hybridome....	80
Tabelle 3.2: Übersicht der Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz an Primatengeweben	91
Tabelle 3.3: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz auf Tumorgewebe	95

Danksagung

Am Zustandekommen dieser Promotionsschrift sind zahlreiche Personen beteiligt, denen ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aussprechen möchte.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Michael Bachmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die geduldige Betreuung dieses eher seltener betretenen Forschungsfeldes. Ich danke ihm für die Ideengebung, die stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik sowie für das zur Verfügung stellen von Material und Arbeitsmöglichkeiten in seinen Labors.

Herrn Prof. Dr. med. Axel Roers, an dessen Institut diese Arbeit fertiggestellt wurde, gebührt mein ganz besonderer Dank für die entscheidenden Hilfestellungen in der Schlussphase der Erstellung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung meiner Stelle und die Gestaltungsfreiheit meiner Arbeit möchte ich Herrn PD Dr. med. Karsten Conrad außerordentlich danken.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Bernhard Kniep bedanke ich mich dafür, dass er mich mit seiner herausragenden Expertise auf dem Gebiet der Glycolipidchemie an dieses Fachgebiet herangeführt und dieses spannende Thema initiiert hat. Darüber hinaus gilt ihm mein Dank für die Überlassung zahlreicher Gangliosidproben.

Für die Arbeiten bei der Herstellung des monoklonalen Antikörpers sowie für ihre Unterstützung in allen Fragen der Zellkultur und für die warmherzige Anteilnahme an den Höhen und Tiefen des Arbeitsalltages sei Frau Christine Gräfe herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. med. Marc Schmitz und seiner Arbeitsgruppe bin ich für die Unterstützung in allen Fragen zu Dendritischen Zellen und für die Überlassung von Antikörpern für die Durchflusszytometrie ausgesprochen dankbar.

Ferner danke ich Herrn PD Dr. med. Michael Muders für die Bereitstellung von Gewebeproben sowie Frau Christina Hiller für die sachgerechte Herstellung der Schnittpräparate von Geweben.

Allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen in Labor und Büro möchte ich für das kameradschaftliche Miteinander, die Hilfsbereitschaft und die moralische Unterstützung sowie die ermutigenden und motivierenden Gespräche danken.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich für Ihre Unterstützung und Toleranz außerhalb des Berufslebens tief verbunden. Vor allem meinen Eltern möchte ich daher an dieser Stelle herzlich dafür danken, dass Sie mir meinen Lebensweg ermöglicht und mir in allen Zeiten eng zur Seite gestanden haben.

Thesen

1. Ganglioside können an ihrer terminalen Sialinsäure oxidiert werden. Für das Gangliosid GD3 ergibt sich durch diese Modifikation GD3-7-Aldehyd.

Diese Modifikation kann unter Bedingungen des oxidativen Stresses entstehen.

2. GD3-7-Aldehyd induziert in der GD3-resistenten Zelllinie Molt-4 Apoptose. Im Vergleich zu GD3 und seinem 9-O-acetylierten Derivat führt GD3-7-Aldehyd zu einer signifikant höheren Apoptoserate. GD3-7-Aldehyd kommt daher als proapoptotisches Effektormolekül in Frage.

3. Der im Rahmen dieser Arbeit generierte monoklonale Antikörper 10C6 gehört der Immunglobulin-Subklasse IgG2a an und bindet an die oxidierte Form des Gangliosids GD3. Das von 10C6 erkannte Antigen ist eine Glycankette der Struktur Neu5Ac-8Neu5Ac-3Gal mit oxidierter terminaler Sialinsäure. Der Antikörper reagiert nicht mit reduzierten oder 9-O-acetylierten Gangliosidvarianten.

4. Das von 10C6 erkannte Antigen kommt auf der Oberfläche von Monozyten einiger Spender vor. Außerdem kann es auf der Oberfläche eines Teils der Blasten bei akuter myeloischer Leukämie gefunden werden.

Andere Leukozyten des peripheren Blutes tragen diese Struktur nicht.

5. In Gewebeschnitten von humanem Mammakarzinom sowie fötaler Milz und fötalem Darm von Primaten befinden sich Strukturen mit oxidativ modifizierter Sialinsäure. Kein untersuchtes adultes Primatengewebe zeigte Reaktivität mit dem monoklonalen anti-GD3-7-al-Antikörper.

6. GD3-7-Aldehyd kommt in den Tumorzelllinien HEp-2, HL60 und T47D vor.

Durch UV-Bestrahlung kann auf der Oberfläche von HEp-2- und SK-Mel-23-Zellen eine mit dem Antikörper 10C6 detektierbare Struktur induziert werden.

GD3 auf der Oberfläche von Melanomzelllinien wie Ma-Mel-11, Ma-Mel-95 und SK-Mel-23 kann durch Natriumperjodatbehandlung zu GD3-7-Aldehyd oxidiert werden.

7. HL60-Zellen sind durch extern zugeführten GD3-7-Aldehyd dekorierbar. Die Substanz bleibt auf ihrer Oberfläche bis zu 48h nachweisbar.

8. Mit GD3-7-Aldehyd als neue Zielstruktur und dem Antikörper 10C6 sind somit Voraussetzungen für die Entwicklung einer neuen adjuvanten Tumorthherapie geschaffen.

ANLAGE 1

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
 - von Herrn Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Michael Bachmann, der das Thema betreute;
 - von Herrn Prof. Dr. med. Axel Roers, an dessen Institut die Arbeit fertiggestellt wurde;
 - von Herrn Dr. rer. nat. Bernhard Kniep, der den Anstoß zu diesem Thema gab und sein Wissen auf dem Gebiet der Gangliosidisolierung vermittelte.
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden bislang nicht veröffentlicht.
6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, den 31.01.2017

ANLAGE 2

Erklärung über die Einhaltung gesetzlicher Bestimmungen

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation:

- das zustimmende Votum der Ethikkommission über die Verwendung von Gewebeproben von Patienten:
Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission:
195092004;
- das zustimmende Votum der Ethikkommission über die Verwendung von Blutproben von Patienten und Spendern:
Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission:
27022006;
- bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
nicht relevant;
- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben:
24(D)-9168.24-1/2007-13;
- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
nicht relevant;
- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, den 31.01.2017